

PROTEINTRANSPORT
IN PLASTIDEN UNTERSCHIEDLICHER
ENTWICKLUNGSSTUFE
AM BEISPIEL
DER KLEINEN UNTEREINHEIT
DER RIBULOSE - 1,5 - BISPHOSPHAT-
CARBOXYLASE

Christine Schindler

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0112

PROTEINTRANSPORT
IN PLASTIDEN UNTERSCHIEDLICHER ENTWICKLUNGSSTUFE
AM BEISPIEL DER
KLEINEN UNTEREINHEIT DER RIBULOSE - 1,5 - BISPHOSPHAT-CARBOXYLASE

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt von
Christine Schindler
aus Freiburg
München, Juni 1987

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. Soll
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 21. August 1987

Inhaltsverzeichnis

Bildverzeichnis	v
1. Einleitung	2
2. Material und Methoden	6
2.1 Material	6
2.1.1 Chemikalien	6
2.1.2 Enzyme	6
2.2 Methoden	7
2.2.1 Isolierung von intakten Plastiden	7
2.2.1.1 Chloroplastenisolierung	7
2.2.1.2 Etioplastenisolierung	7
2.2.1.3 Proplastidenpräparation	8
2.2.2 Präparation des Weizenkeimsystems	9
2.2.3 Isolierung und Aufreinigung von polyA + mRNA	9
2.2.3.1 Isolierung nach MANIATIS, Aufreinigung durch Affinitätschromatographie	9
2.2.3.2 Aufreinigung durch Hybridisierung	10
2.2.4 Konstruktion des pSSU - ompA - clones	11
2.2.4.1 Bakterienanzucht und Plasmidisolation	11
2.2.4.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen	13
2.2.4.3 Agarosegelelektrophorese	13
2.2.4.4 Isolation von Restriktionsfragmenten aus dem Agarosegel	14
2.2.4.5 Klonieren	14
2.2.4.6 Sequenzieren	15
2.2.5 in vitro - Transkription im SP 6 - System	17
2.2.6 in vitro - Translation im Weizenkeim - System	18
2.2.7 Aufnahmebedingungen für den Transport	19
2.2.8 Polyacrylamidgelelektrophorese	19
2.2.8.1 Denaturierendes System	19
2.2.8.2 Nicht denaturierendes System	21
2.2.8.3 Fluorographie und Autoradiographie	21
2.2.9 Quantifizierung des Imports	21
2.2.10 Immunoblot	22
2.2.11 Chlorophyllbestimmung	22
2.2.12 Proteinbestimmung	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Proteintransport in intakte, gereinigte Erbsenetioplasten	23
3.2 Proteintransport in intakte, gereinigte Erbsenchloroplasten	32
3.3 Proteintransport in Proplastiden	42
3.4 Konstruktion des pSSu - ompA - Klons	46
4. Diskussion	50
5. Zusammenfassung	57
6. Literatur	58

Bildverzeichnis

Bild 1.	Überblick über Transportprozesse am Envelope	2
Bild 2.	Membransysteme bei Chloroplasten, Mitochondrien und gram-neg. Bakterien	3
Bild 3.	Vergleich der Translationsprodukte verschiedener mRNAs	18
Bild 4.	Elektronenmikroskopische Aufnahme von intakten, gereinigten Etioplasten	23
Bild 5.	"latency" stromaler Proteine am Beispiel der großen Untereinheit ...	24
Bild 6.	Autoradiogramm von Transport und Prozessierung von pSSu	25
Bild 7.	Vergleich der angebotenen Vorstufen mit den aufgenommenen Proteinen	26
Bild 8.	Kinetik des Proteintransports in intakte, gereinigte Erbsenetioplasten	27
Bild 9.	Autoradiogramm des ATP-abhängigen Transports von pSSu in Etioplasten	27
Bild 10.	Autoradiogramm des ATP-abhängigen Transports von pSSu in Etioplasten	28
Bild 11.	Hemmung des Proteintransports durch NaF	28
Bild 12.	Autoradiogramm zur Hemmung des Proteintransports durch NaF	29
Bild 13.	Zusammenbau von transportiertem Vorstufenprotein und LSU im Etioplasten	31
Bild 14.	Bindungstest von Vorstufenproteinen	32
Bild 15.	Proteintranslocation in Chloroplasten benötigt ATP-Hydrolyse	33
Bild 16.	Test verschiedener ATP-Quellen	34
Bild 17.	Einfluß von Hexokinase auf den Transport von pSSu	35
Bild 18.	Hemmung des Proteintransportes durch alkaline Phosphatase	36
Bild 19.	Wirkung von Elektronentransferinhibitoren auf die Translocation von pSSu	37
Bild 20.	Wirkung des K-Ionophors Valinomycin auf den Proteinimport	38
Bild 21.	Proteintransport in Gegenwart von Natriumpyrophosphat	39
Bild 22.	Proteintransport in Gegenwart von ADP	40
Bild 23.	Proteintransport in Gegenwart von NaF	40
Bild 24.	Die hemmende Wirkung von NaF auf den Import ist reversibel	41
Bild 25.	Temperaturabhängigkeit des Proteintransportes	42
Bild 26.	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Proplastiden	43
Bild 27.	Autoradiogramm von Transport von pSSu	44
Bild 28.	Westernblot mit Antikörper gegen Kopplungsfaktor	45
Bild 29.	Westernblot mit Antikörper gegen LSU	45
Bild 30.	Schematische Darstellung des Konstruktionsweges des pSSu-ompA-Klons	47
Bild 31.	Nachweis des pSSu-Klons	48
Bild 32.	Nachweis des pSSu-ompA-Klons	49
Bild 33.	Entwicklungswege des Plastiden	50

Liste der verwendeten Abkürzungen

AMP-PCP	β , γ -methylenadenosin-5-triphosphat
AMP-PNP	5-adenylymidodiphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydraxon
DCMU	3-(3,4-dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d NTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
dd NTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GpppG	Diguanosintriphosphat
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperacin-N'-2-ethan
KD	molekulare Masse in kilo Dalton
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LSu	große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase
Mops	3(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NTP	Nukleotidtriphosphate
OAA	Oxalacetat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEP	Phosphoenolpyruvat
pSSu	Vorstufenprotein der kleinen Untereinheit
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSu	kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase
Temed	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N'-(2-Hydroxyl-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Einleitung

Chloroplasten höherer Pflanzen besitzen drei unterschiedliche Membranen. Neben den Thylakoidmembranen im Inneren des Organells, an denen die Lichtreaktionen der Photosynthese stattfinden, sind die Chloroplasten von zwei Einheitsmembranen, dem inneren und äußeren Envelope, umgeben (DOUCE et JOYARD, 1979, und KEEGSTRA et al., 1984). Diese Hüllmembranen unterscheiden sich sehr in ihrer Permeabilität. Während die äußere Membran für kleine Moleküle bis zu einem Gewicht von 10 kD passierbar ist, stellt die innere Membran die eigentliche Permeabilitätsschranke dar (HELDT et SAUER, 1971). Der Austausch von Ionen und Metaboliten wird über spezifische Translokatoren bewerkstelligt (Bild 1).

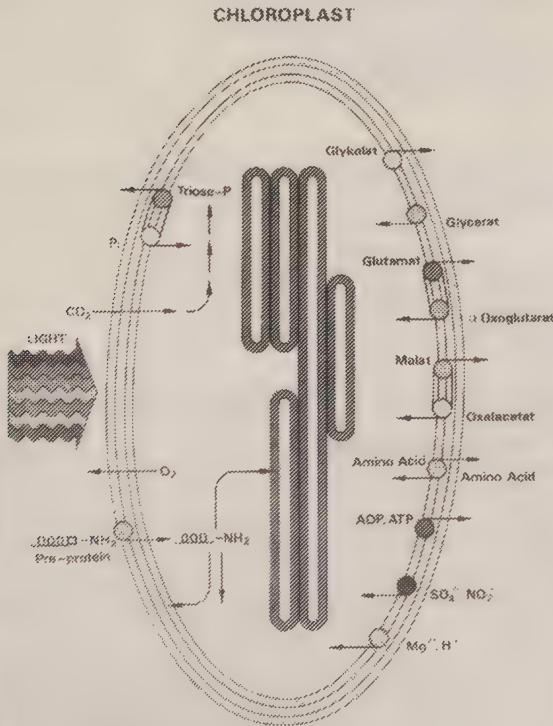


Bild 1. Überblick über Transportprozesse am Envelope

Eine weitere wichtige Rolle spielt das Envelope beim Transport von Vorstufenproteinen, wobei der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist. An der Biogenese von Plastidproteinen sind zwei genetische Systeme beteiligt; die Plastiden-DNA codiert nur für einen geringen Anteil dieser Proteine.

Die Mehrzahl der Proteine wird im Zellkern codiert, an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und durch die Hüllmembranen in den Plastiden transportiert (CHUA et SCHMIDT, 1979). Mitochondrien und gram-negative Bakterien sind ebenso von einer Doppelmembran umgeben, die ähnliche Aufgaben zu bewältigen hat (Bild 2).

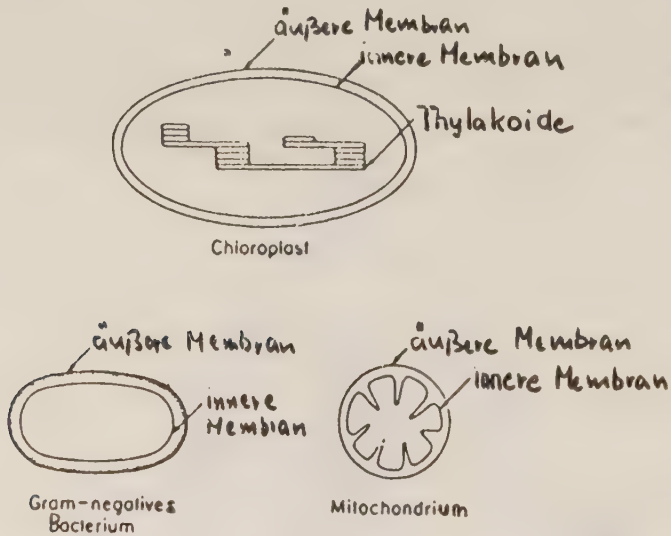


Bild 2. Membransysteme bei Chloroplasten, Mitochondrien und gram-neg. Bakterien

Es läßt sich nun eine Arbeitshypothese mit zwei unterschiedlichen Mechanismen für den Transport von Proteinen über Membranen aufstellen:

- Bei dem cotranslationalen Mechanismus erfolgt der Transport des Proteins über die Membran während der Synthese z.B. an ER-Membranen (BLOBEL et DOBBERSTEIN, 1975).
- Bei dem posttranslationalen Mechanismus ist die Proteinsynthese abgeschlossen, bevor der Transport erfolgt (CHUA et SCHMIDT, 1978 und NEUPERT et SCHATZ, 1981).

Zu Beginn dieser Arbeit war folgendes über den Proteintransport in Chloroplasten bekannt: Kerncodierte Proteine werden als Vorstufenproteine an freien Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert. Diese Vorstufenproteine enthalten zusätzliche Aminosäuren an der N - terminalen Seite, denen eine Art Signalfunktion zukommt. Noch nicht näher untersuchte Rezeptorproteine in der äußeren Envelope erkennen die Vorstufenproteine in einem energieunabhängigen Schritt (PFISTERER et al., 1982). Der Durchtritt durch die Membran benötigt dagegen Energie (GROSSMAN et al., 1980). Anschließend findet die Prozessierung (Abspaltung der Signalsequenz durch eine Peptidase) und die Assemblierung statt (SMITH et ELLIS, 1979).

Da sich gerade bei den kern-codierten Proteinen der Synthesort von ihrem späteren Wirkort unterscheidet, kommt den Membranen, in diesem Fall der Hüllmembran, die für eine Kompartimentierung innerhalb der Zelle verantwortlich ist, eine große Bedeutung zu.

Chloroplasten mit einem ausgedehnten Thylakoidmembransystem findet man nur in ergrünenden Pflanzen. Im Dunkeln gewachsene Angiospermen können kein Chlorophyll bilden und besitzen in ihren Mesophyllzellen Etioplasten ohne voll entwickeltes Membransystem (Prothylakoiden, daneben Prolamellarkörper) (KIRK et TILNEY-BASSETT, 1978). Ebenso zeigen sich Unterschiede in der Envelopemembran (SOLL et al., 1986).

Etioplasten können im Licht in Chloroplasten umgewandelt werden. Als Modellprotein für die vorliegende Arbeit diente die Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (E.C. 4.1.1.39) aus Erbse, ein lösliches Stromaprotein. Dieses Enzym setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen: die große Untereinheit (LSU, 52 kD) wird im Plastiden codiert und synthetisiert, die kleine Untereinheit (SSU) wird als Vorstufenprotein (pSSU, 20 kD) im Cytoplasma synthetisiert und anschließend in den Chloroplasten transportiert, wo es zum reifen Protein (14 kD) prozessiert wird. Der Holo-komplex entsteht durch Assemblierung von je acht großen und kleinen Untereinheiten (SMITH et ELLIS, 1979).

Die Biosynthese von Rubisco ist lichtreguliert. LSU und LSU-mRNA sind in etiolierten Keimlingen nachweisbar. Der Gehalt an SSU und SSU-mRNA liegt dagegen unter der Nachweisgrenze, steigt aber nach 48 Stunden Belichtung stark an (BENNET et al., 1984).

Bis zu Beginn dieser Arbeit wurde Proteintransport nur an Chloroplasten untersucht. Es schien sinnvoll, den Transport auch an isolierten, intakten Etioplasten zu untersuchen, um so eine Vergleichsmöglichkeit des Vorgangs an unterschiedlich ausdifferenzierten Plastiden zu haben.

Der posttranslationale Transport von Proteinen benötigt Energie. Bei vielen Ähnlichkeiten der Membransysteme von Chloroplasten und Mitochondrien besteht gerade im Aufbau der inneren Membran folgender Unterschied: Sie ist bei den Mitochondrien sehr viel stärker gefaltet und Träger der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung. Photophosphorylierung findet in den Chloroplasten dagegen an der Thylakoidmembran statt. Vorstufenproteine, die in die Mitochondrienmatrix transportiert werden, passieren eine Membran, die ATP synthetisiert; Vorstufenproteine, die für das Stroma bestimmt sind, werden über die Hüllmembran transportiert, die nicht an der ATP-Synthese beteiligt ist. Die Energieabhängigkeit wurde an Mitochondrien bei mehreren Proteinen nachgewiesen. Der Transfer des ADP/ATP-carriers und der ATPase - Untereinheit 9 benötigt ausschließlich das elektrische Membranpotential (SCHLEYER et al., 1982). In vivo - Versuche von SCHATZ und Mitarbeitern (NELSON et SCHATZ, 1979) an den Untereinheiten α , β , und γ der F_1 -ATPase und an Cytochrom C zeigen, daß ATP die verwendete Energieform sein kann, um das Membranpotential aufzubauen. In vivo - Versuche zum Import von Cytochrom B in isolierte Mitochondrien dagegen führen zu der Erkenntnis, daß der elektrochemische Gradient benötigt wird (GASSER et al., 1982, PFANNER et NEUPERT, 1986).

Für die Translokation von alkaliner Phosphatase und dem äußeren Membranprotein ompA in E. coli - Membranvesikel ist ATP essentiell (CHEN et TAI, 1985). Ebenfalls



wird für die Translokation eines sekretorischen Proteins von Hefe, prepro- α -factor, in mikrosomale Membranen ATP benötigt (WATERS et BLOBEL, 1986).

Zum Energieaspekt bei Chloroplasten lagen zu Beginn dieser Arbeit sehr wenige Untersuchungen vor. GROSSMAN et al., 1980, konnten als Erste zeigen, daß der Proteintransport in Erbsenchloroplasten Energie benötigt. Sie fanden eine Lichtstimulierung des Proteinimports, die durch Zugabe von Entkopplern inhibiert werden konnte. Die entsprechend herabgesetzte Rate im Dunkeln konnte durch Zugabe von exogenem ATP erhöht werden.

KEEGSTRA et al., 1984, zeigte eine Inhibierung des Transports durch Nigericin. Bei diesen Arbeiten blieb jedoch unklar, ob ATP als direkte Energiequelle (ATP-Hydrolyse) benötigt wird oder indirekt zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten dient. Es ist schwierig, die direkte Rolle der Protonenmotorischen Kraft von der indirekten Rolle der Synthese von ATP zu unterscheiden. Eine mögliche Beteiligung des Membranpotentials sollte durch Zugabe von Entkopplern und Ionophoren geprüft werden. Durch Änderungen des ATP-Spiegels sowohl innerhalb als auch außerhalb des Chloroplasten in einem definierten System sollte die Rolle des ATPs geklärt werden.

Weiterhin war bekannt, daß in der äußeren Envelopemembran eine Kinase lokalisiert ist (SOLL, 1983, 1985), deren Funktion noch nicht geklärt ist. Man findet Phosphorylierung äußerer und innerer Envelopeproteine.

Aus anderen Gebieten ist bekannt, daß etwa der Rezeptor des 'growth factors' Kinaseaktivität besitzt (HUNTER et COOPER, 1985). Bei Bindung des Liganden findet sowohl Autophosphorylierung des Rezeptors als auch Phosphorylierung anderer Substrate, als eine Form der Informationsweiterleitung, statt. So sollte, wenn ATP die benötigte Energieform ist, vielleicht ein Zusammenhang zwischen der Aktivität dieser Kinase und dem Proteintransport bestehen.

Die Möglichkeit zum Import eines Hybridproteins sollte am Beispiel einer Genkonstruktion eines pSSu-ompA-Klons überprüft werden. Die Präsequenz sollte gewährleisten, daß nach erfolgter Transkription im SP 6 - und Translation im Weizenkeimsystem das Hybridprotein beim Transportversuch die Hüllmembran erkennen kann. Das ompA-Protein ist in der äußeren E. coli - Membran lokalisiert und teilweise trypsin-sensitiv. Über eine Funktion bei der Phagenbindung wird spekuliert (DI RIENZO et al., 1978). Das Protein wird als precursor im Cytoplasma synthetisiert und nach der Prozessierung in die äußere Membran inseriert.

Sowohl für Prokaryonten als auch für Eukaryonten wurden mehrere Hypothesen zur Erklärung des eigentlichen Mechanismus - des Durchtritts des Proteins durch die Membran - aufgestellt. Die Möglichkeit einer Konformationsänderung des Vorstufenproteins (von einer β -Struktur zu einer α -Helix) während der Translokation scheint zu bestehen (DUFFAUD et al., 1985). SCHLEYER et NEUPERT, 1985, können zeigen, daß Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien bevorzugt an sogenannten "Kontaktstellen", d.h. Stellen mit enger Verbindung von innerer und äußerer Membran, stattfindet. Für Chloroplasten steht dieser Nachweis noch aus, die Kontaktstellen sind aber ebenfalls vorhanden, wie an EM - Aufnahmen gezeigt werden konnte. Es sollte nun überprüft werden, ob dieses Hybridprotein in der Hüllmembran steckenbleibt oder sie passieren kann. Abschließend sollte der Proteintransport an den Vorstufen der Plastiden, den Proplastiden, untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose	SeaKem ME, Mar. Coll Div. (Rockland, USA)
Hefeextrakt, Trypton	Difco Laboratories (Detroit, USA)
CsCl	Chemetall GmbH (Frankfurt a.M.)
GpppG	Pharmacia (Freiburg i.B.)
Percoll	"
Nitrocellulose, 0.45 μ m	Schleicher & Schüll, Dassel
35 S-Methionin, 32 P-UTP	Amersham-Buchler (Braun- schweig)
Nicht radioaktive Nukleotide (ATP, CTP, UTP, GTP, TTP) und die entsprechenden Des- und Didesoxynukleotide	Boehringer (Mannheim)
SP 6 und T ₇ -Primer	"
ATP-Analoge (AMP-PNP und AMP-PCP	Sigma (München)
Valinomycin, A 23187, CCCP und DCMU	"
Aminophenolthioether	Aldrich (Steinheim)
Blotfarbstoff	
5-Bromo-4-Chloro-3-indoxyl-phosphatptoluidin)	Sigma (München)
Alle übrigen Chemikalien waren p.A.-Substanzen der Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München).	

2.1.2 Enzyme

alkaline Phosphatase aus Kälberdarm	Boehringer (Mannheim)
Hexokinase, antiRabbit IgG/ alk. Phosphatase	Sigma (München)
anorgan. Pyrophosphatase, Pyruvatkinase	"
T ₄ -DNA-Ligase und SP 6/T ₇ -Polymerase,	
RNAase-Inhibitor	Boehringer (Mannheim)

Restriktionsenzyme wurden von Boehringer (Mannheim) respektive Biolabs (Bad Schwalbach), BRL (Neu-Isenburg) oder PL-Biochemicals (St. Goar) bezogen und nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen eingesetzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von intakten Plastiden

2.2.1.1 Chloroplastenisolierung

Isolierung intakter Chloroplasten aus Erbsenblättern nach NAKATANI et BARBER, 1979, und CLINE et al., 1981 : Isolationsmedium (Volumen 1l):

- 20 mM Mops
- 13 mM Tris
- 330 mM Sorbit
- 0.4 mM $MgCl_2$
- 0.1% (w/v) BSA, pH 7.2

Waschmedium : (Volumen 250 ml)

- 330 mM Sorbit, mit 1 M Tris auf pH 7.6 eingestellt

Percoll - Gradienten : (2)

- 40% (v/v) Percoll in 50 mM Mops/KOH (pH 7.6) und 330 mM Sorbit
- 80% (v/v) Percoll in 50 mM Mops/KOH (pH 7.6) und 330 mM Sorbit

8 ml der 80%igen Percoll - Lösung werden mit 12 ml der 40%igen Lösung überschichtet.

Die Erbsen (*P. sativum* cv. "Rosa Krone" der Bayerischen Futtersaatbau München) werden für 10 bis 14 Tage im Gewächshaus angezogen.

In einem vorgekühlten Mixer werden 40 g Erbsenblätter mit 400 ml Isolationsmedium 4 bis 5 mal für wenige Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wird durch ein Baumwolltuch und Nylongaze (30 μ m Porenweite) filtriert und 10 min bei 1000 g (A 8.24) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet im restlichen Überstand mit einem Pinsel resuspendiert, auf gekühlte Percoll - Gradienten aufgetragen und für 10 min bei 6500 g im Vertikalrotor zentrifugiert (AV 8.19). Es bilden sich zwei grüne Banden, wobei die obere aufgebrochene Chloroplasten enthält. Die untere Bande mit intakten, gereinigten Plastiden wird abpipettiert, mit etwa 40 ml Waschmedium versetzt und für 30 sec bei 1000 g (A 8.24) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in der restlichen Lösung vorsichtig mit dem Pinsel resuspendiert.

Nach Bestimmung des Chlorophyllgehalts (ARNON, 1949) wird die Chloroplastensuspension auf eine Konzentration von 1 mg Chlorophyll pro ml gebracht und so für die Transportversuche eingesetzt.

2.2.1.2 Etioplastenisolierung

Isolationsmedium : (Volumen 2l)

- 0.5 M Sucrose
- 1 mM EDTA
- 1 mM $MgCl_2$
- 30 mM Tricin/KOH (pH 7.2)

- 0.1% (w/v) BSA

Waschmedium : (Volumen 200 ml)

- entsprechend dem Isolationsmedium ohne BSA

Percollgradienten : (4)

- 30% (v/v) Percoll in Isolationsmedium
- 80% (v/v) Percoll in 0.5 Sucrose und 25 mM Tricin/KOH (pH 7.2)

20 ml der 30%igen Percoll - Lösung werden mit 5ml der 80%igen Lösung unterschichtet und im Vertikalrotor 50 min bei 10000 g vorzentrifugiert, um einen kontinuierlichen Gradienten zu formen.

Erbsen (*P. sativum* cv. "Miranda" der Bayerischen Futtersaatbau München) werden auf Vermiculith angesät und für 10 bis 13 Tage im Dunkeln angezogen. In grünem Sicherheitslicht werden die Primärblätter in 1.5 l eisgekühltes Isolationsmedium hinein abgeerntet (Blattfrischgewicht 150 bis 200 g) und mit einem vorgekühlten Mixer mit Spezialmessern (BRAUN Mixer) nach KANNANGARA et al., 1977, 5 mal für jeweils 2 sec auf schnellster Stufe homogenisiert.

Das Homogenat wird über ein Baumwolltuch und eine Nylongaze (30 µm Porenweite) abfiltriert, der Rückstand nochmals in etwas Isolationsmedium homogenisiert, nochmals abfiltriert und die vereinigten Filtrate 10 min bei 2300 g (A 6.9) pelletiert. Der Überstand wird verworfen, die pelletierten Etioplasten mit einem weichen Pinsel in etwa 10 ml Isolationsmedium suspendiert und auf die vorgeformten Percollgradienten aufgetragen. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 6500 g im Vertikalrotor (AV 8.19) sammeln sich die intakten Etioplasten über der 80%igen Lösung. Die Bande wird mit einer Pipette aufgenommen, mit Waschmedium auf ca. 40 ml verdünnt und für 7 min bei 2500 g pelletiert.

Für die Transportversuche werden die Etioplasten in Waschmedium resuspendiert (Endkonzentration 1 mg Protein pro ml).

Auf Verunreinigung der Etioplasten durch Mitochondrien und Peroxisomen wurde mit Cytochrom-c-oxidase bzw. Hydroxypyruvatreductase als Markerenzyme getestet (JACKSON et MOORE, 1979).

Um die Unversehrtheit der Hüllmembranen zu überprüfen, wurden die gereinigten Etioplasten Percoll-frei gewaschen, in Aliquote aufgeteilt und pelletiert. Die Plastiden wurden in Puffer unterschiedlicher Saccharose-Konzentration resuspendiert und 15 Min auf Eis stehen gelassen, um so das Platzen der Plastiden im hypotonischen Puffer zu ermöglichen. Anschließend wurden die Etioplasten wieder pelletiert (3000 g für 5 Min). Um den Anteil an LSu im Überstand zu bestimmen, wurde dieser mit Trichloressigsäure ausgefällt, die ausgefällten Proteine über PAGE aufgetrennt und nach erfolgter Anfärbung mit Coomassie blue bei 583 nm gescant (VITATRON-Densitometer TLD 100). Die Ergebnisse wurden mit einem VITATRON-Integrator quantifiziert.

2.2.1.3 Proplastidenpräparation

Die Isolierung der Proplastiden erfolgte in Anlehnung an die Etioplastenpräparation (ALEFSON, Diplomarbeit 1987), d.h. es wurden die gleichen Medien und Zentrifugationszeiten verwendet.

Die Erbsen (*P. sativum* cv. "Rosa Krone") wurden nach Anquellen über Nacht auf Vermiculith angesät und für drei Tage im Dunkeln angezogen. Verwendet wurde das meristematische Gewebe des Hypocotyls.

2.2.2 Präparation des Weizenkeimsystems

Die Präparation erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von ROBERTS et PATERSON, 1973.

6 g Weizenkeime wurden in einer Porzellanschale mit einem Pistill unter leichtem Druck gemörsert und mit einem Chloroform-/Cyclohexangemisch (15 zu 1) versetzt. Die Embryonen steigen an die Oberfläche, werden abgesaugt und über Nacht an der Luft getrocknet.

Die Weizenkeime werden durch vorsichtiges Mörsern bei 4° C mit Extraktionspuffer (100 mM KCl, 1 mM Mg-acetat, 2 mM $CaCl_2$, 20 mM Hepes/KOH, pH 7.6) aufgeschlossen und das Homogenat 10 min bei 30000 g (A 8.24) abzentrifugiert. Der Überstand wird mit Mg-acetat (Endkonz. 3.5 mM), ATP (1 mM), GTP (20 μ M), DTE (2 mM), Creatinphosphat (8 mM) und Creatinkinase (40 μ g) versetzt und auf eine SEPHADEX - Säule (G 25 coarse) aufgetragen. Die Säule wird zuvor mit Hepes/KOH (pH 7.1, 20 mM, 120 mM KCl, 5 mM Mg-acetat) equilibriert. Die trüben Fraktionen werden in 1 - 2 ml-Portionen eluiert und die Extinktion bei 280 nm gemessen. Nur die vor dem Extinktionsmaximum liegenden Fraktionen werden gesammelt und portionsweise eingefroren.

2.2.3 Isolierung und Aufreinigung von polyA + mRNA

2.2.3.1 Isolierung nach MANIATIS, Aufreinigung durch Affinitätschromatographie

Die Isolierung erfolgte in Anlehnung an MANIATIS et al., 1982. Gesamt-RNA wurde von Erbsen (*P. sativum* cv. "Rosa Krone") gewonnen, die 3 bis 4 Tage im Dunkeln angezogen und anschließend für 48 bis 72 Stunden belichtet wurden.

10 g Primärblätter wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, die Zellen durch kurzes Mixen mit einer 4.2 M Guanidiniumrhodanidlösung aufgebrochen und bei 30000 g (A 8.24) und 20°C 15 Min lang abzentrifugiert. Der grüne Überstand wurde mit CsCl versetzt (Endkonzentration 0.4 M), auf ein 5.7 M CsCl-Kissen geschichtet und für 24 Stunden bei 90000 g (TST 28) zentrifugiert.

Das RNA-pellet wurde in 7.5 M Guanidiniumchlorid aufgenommen und zweimal mit Ethanol gefällt. Poly-A - haltige mRNA wurde mittels Affinitätschromatographie (ALBERTS et HERRICK, 1971) an oligo-(dT)-Cellulose (Type 2, PAESEL) aufgereinigt: Die gefällte RNA wurde in "high salt"- Puffer (0.5 M NaCl und 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) gelöst und die poly-A-mRNA an der oligo-(dT)-Cellulose gebunden. Anschließend wurde mehrmals mit Bindungspuffer gewaschen und dann die poly-A-mRNA mit "low salt" - Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) eluiert. Die UV-absorbierenden Eluate wurden gesammelt, mit 1/20 Volumen 4 M KCl und 2.5 Vol. Ethanol versetzt und über Nacht bei -20° C gefällt.

Die RNA wurde am nächsten Morgen für 40 Minuten bei 120000 g (TST 28) zentrifugiert, einmal mit Ethanol (70%) gewaschen und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) aufgenommen. Die Aufbewahrung erfolgte bei -192°C. Zur Quantifizierung wurde 1 bis 2 μ l RNA - Suspension in Aq. bidest. bei 260 nm photometrisch gemessen.

Die Ausbeute lag für 10 g Erbsenblätter bei 300 bis 500 μg RNA.

2.2.3.2 Aufreinigung durch Hybridisierung

Die Aufreinigung in entweder nur für pSSU translatierbarer RNA oder nur für pLHCP erfolgte mittels einer Hybridisierungsmethode (BÜNEMANN et al., 1982). Zu diesem Zweck wurden uns die Klone SSU 60, SSU160 und Fa/b31 von ELLIS zur Verfügung gestellt. Die Plasmidisolierung erfolgte nach der Methode von BIRNBOIM et DOLY, 1979.

Hybridisationsmedium

- 50% (v/v) deionisiertes Formamid
- 1 mM EDTA
- 0.6 M NaCl
- 0.2% SDS
- 20 mM Pipes (pH 6.4)

FA/SSC - Medium

- 50% (v/v) deionisiertes Formamid
- 2xSSC
- 0.2% SDS

1xSSC

- 0.15 M NaCl
- 0.015 M Na-citrat

Präparation von Aminophenolthioether (APTE) - Sephacryl-S 500

50 g Sephacryl S-500 wird nach mehrmaligem Waschen mit H_2O bidest. auf einer Glasfritte in eine 250 ml-Sovirelflasche überführt, mit 50 ml 1 M NaOH und 4.2 ml 1,4-Butandiolglycidylether versetzt, gut verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Kopf-über-Kopf - Schüttler geschwenkt. Die Flüssigkeit wird auf einer Glasfritte abgesaugt, der Gelkuchen zurück in die Flasche transferiert, 57 ml Aceton und 7.1 ml 2-Aminothiophenol hinzugefügt und wieder über Nacht bei RT geschüttelt.

Das Gel wird auf einer Glasfritte mit folgenden Lösungen in der angegebenen Reihenfolge gewaschen: Aceton, 0.1 M HCl, H_2O , 0.1 M HCl, H_2O . Der Vorgang wird solange wiederholt, bis das Gel geruchsfrei ist.

Diazotierung von APTE-Sephacryl-S 500

3 g APTE-Sephacryl-S 500 werden in einer Glasfritte mit 100 ml H_2O bidest. gewaschen. Das Gel wird in 13 ml 1.4 M HCl resuspendiert und auf Eis gestellt. Eine NaNO_2 -Lösung (10 mg/ml) wird in 100 μl -Aliquoten zugegeben (Reaktion wurde mit Jod-Stärke-Papier überprüft).

Der Diazotierungsansatz wird in eine eiskalte Fritte überführt, mit 100 ml eiskaltem Wasser und 20 ml einer kalten Mischung von 2 Volumenteilen 50 mM Na-Borat (pH 8) und 8 Volumenteilen DMSO gewaschen. 0.2 g des aktivierten Materials werden

mit 50 - 100 μg denaturierter DNA versetzt, geschüttelt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Präparation von beschallter denaturierter DNA

DNA wird 4-5 sec bei Stufe 5 (BRANSON-sonifier, Mikrospritze) beschallt und mit Ethanol gefällt (0.05 Vol 4 M Na-acetat bei pH 6, 2.5 Vol Ethanol). 50 - 100 μg DNA werden in 20 μl 50 mM Na-borat (pH 8) gelöst und durch Zugabe von 80 μl DMSO denaturiert.

Vorbehandlung des Gels nach erfolgter Kupplung

Die DNA-Matrix wird mehrmals mit Wasser gewaschen, anschließend in Hybridisationsmedium resuspendiert und 5 h bei 70° C inkubiert. Die Matrix wird anschließend 4-5 mal mit 0.4 M NaOH gewaschen, mit H_2O neutralisiert und 1 h im Hybridisationsmedium equilibriert.

Hybridisationsprozedur

Die DNA - Matrix wird in Hybridisationsmedium gewaschen, kurz abzentrifugiert, in einem Gemisch von 20 mM Pipes (pH 6.4), 1 mM EDTA, 0.6 M NaCl, 0.2% SDS, 50% (v/v) FA und 20 μg poly-A - RNA aufgenommen und für 4 Stunden bei 42°C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert.

Das Material wird daraufhin in eine kleine Plastiksäule (Bio Rad Econocolumn) überführt und mehrmals mit FA/SSC - Medium gewaschen. Anschließend wird die Matrix in einen Eppendorf-Hut pipettiert, mit 500 μl heißen Wassers (90°C) resuspendiert und für 90 sec inkubiert. Der Inhalt des Eppendorf-Huts wird vollständig in eine Plastiksäule zurückgegeben, die einmal mit 90°C heißem Wasser eluiert wird. Das Eluat wird aufgefangen, mit Na-acetat (pH 6, Endkonzentration 0.4 M) und dem doppelten Volumen Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C stehen gelassen. Die RNA präzipitiert. Am nächsten Morgen wird für 15 min bei 120000 g (TST 28) zentrifugiert, das RNA - pellet zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in sterilem Aq. bidest. gelöst.

2.2.4 Konstruktion des pSSU - ompA - clones

2.2.4.1 Bakterienanzucht und Plasmidisolation

Kulturmedium (5xML-Medium)

- 5% Bacto-Trypton
- 2.5% Hefeextrakt
- 860 mM NaCl

1 l-Kulturen (1xML-Medium) wurden mit E. coli mittels einer Impföse angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt (Ampicillin-Konzentration 100 mg/l).

Die DNA-Isolation aus E. coli erfolgte nach der Methode von BIRNBOIM et DOLY, 1979 (siehe 3.2.3.2).

Lösung 1

- 25 mM Tris/HCl pH 8.0
- 10 mM EDTA
- 50 mM Glucose
- Lysozym-Stammlösung 25 mg/ml

Lösung 2

- 0.2 M NaOH
- 1% SDS

Lösung 3

- 3 M NaAc pH 5.0

662

- 6 mM NaCl
- 6 mM Tris/HCl pH 7.4
- 0.2 mM EDTA

Die Bakterien (1 l Kultur) wurden (ohne Amplifikation) geerntet (Zentrifugation 2300 g für 30 min bei 4°C; A 6.9), in 40 ml Lösung 1 resuspendiert, mit 2 ml Lysozymlösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 75 ml Lösung 2 und 50 ml Lösung 3 unter vorsichtigem Schwenken wurde die Bakteriensuspension für 1 h auf Eis belassen. Die Bakterienreste wurden bei 2500 g für 30 min bei 4°C pelletiert (A 6.9). Nach Filtration des Überstandes über Verbandmull wurde aus der klaren Lösung die Plasmid-DNA gefällt (2/3 EtOH techn., 2 h bei -20°C).

Die DNA wurde sedimentiert (2500 g für 30 min bei 4°C, A 6.9), in 18 ml 662-Puffer aufgenommen, mit 1 M Tris-Lösung neutralisiert und mit CsCl versetzt (25 ml DNA-Lösung, 25 g CsCl, 10 mg Ethidiumbromid). Zur Auftrennung von superhelikaler, linearer, zirkulärer und chromosomaler DNA wurde im Ethidium-CsCl-Gradienten zentrifugiert (42000 rpm für 20 h bei 20°C; TV 850).

Die superhelikale Plasmid-DNA bandiert aufgrund der geringeren Ethidiumbromid-Einlagerung als unterste Bande im Gradienten und wird mit einer 2 ml-Einmalspritze dem Gradienten unter UV-Licht entnommen.

Das Ethidiumbromid wird mit 662-gesättigtem Isobutanol ausgeschüttelt, die DNA auf das doppelte Volumen mit 662 aufgefüllt und mit 1/10 Vol. LiCl und 2.5 Vol. EtOH p.A. für 1 h bei 4°C gefällt. Nach wiederholter Ethanolgefällung wird die Plasmid-Konzentration bestimmt (etwa 1 mg Plasmid-DNA pro 1 l Kultur).

Zur Identifizierung von rekombinanten Plasmiden nach erfolgter Ligation und Wachstum auf Agarplatten wurden einzelne Klone in 3 ml 1xML-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht angezogen.

1.5 ml Kultur werden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen sedimentiert (2 min in der Eppendorf-Zentrifuge). Der Niederschlag wird in 100 µl Lösung 1 resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 150 µl Lösung 2 und 120 µl Lösung 3 versetzt und durchmischt. Nach zweiminütiger Zentrifugation wird der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, phenolisiert (370 µl Phenol) und die Plasmid-DNA mit 2.5 Vol. Ethanol für 1 h bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wird mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet.

2.2.4.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen

2.2.4.2.1 Verdau von Plasmid-DNA aus 1.5 ml-Kulturen

Die aus 1.5 ml Kultur gewonnene Plasmid-DNA wurde für fünf Verdau herangezogen.

2.2.4.2.2 Verdau von CsCl-gereinigter Plasmid-DNA (1 l-Kultur)

Die Verdauungen mit den angegebenen Restriktionsendonucleasen wurden mit 1 µg CsCl-gereinigter Plasmid-DNA pro 20 µl Reaktionsansatz mit 1 µl Enzym (unterschiedliche Einheiten je nach Enzym, Minimum 2 Einheiten) für 1 h nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt.

2.2.4.2.3 Präparativer Verdau von Ausgangsvektoren

Für den präparativen Verdau der Ausgangsklone wurden bis zu 50 µg Plasmid-DNA pro 200 µl Reaktionsansatz verwendet.

Bei Mehrfachverdau wurde zuerst mit einem Enzym verdaut, danach eine Ethanol-fällung durchgeführt, die Plasmid-DNA in H₂O bidest. gelöst (1 mg/ml) und dann ein weiterer Verdau angeschlossen.

2.2.4.3 Agarosegelelektrophorese

Elektrophoresepuffer (10xTBE)

- 900 mM Borsäure
- 900 mM Tris
- 20 mM EDTA pH 8.0

DNA-Farblösung

- 40% Saccharose
- 100 mM EDTA pH 7.4
- 0.25% Bromphenolblau
- 0.25% Xylencyanol

Ethidiumbromid

- 0.5 µg Et-bromid/ml

Die Agarosegele wurden im 1x-Puffer gegossen und im gleichen Puffer laufen gelassen.

Zur Analyse von Restriktionen sowie zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten für die Klonierung wurden 1.5%ige Agarosegele verwendet. Nach dem Lauf wurden die im UV-Licht fluoreszierenden Banden mit einer Polaroidkamera photographiert (Durchlichtplatte 310 nm, Polaroidfilm 667, Belichtung 30 sec bei Blende 11).

2.2.4.4 Isolation von Restriktionsfragmenten aus dem Agarosegel

Waschlösung

- 662-Puffer (siehe unter 2.2.4.1)

Elutionslösung

- 20% EtOH
- 1 M LiCl
- 1 mM EDTA
- 10 mM Tris/HCl pH 7.5

Die Plasmid-DNA aus dem Restriktionsverdau wird in einem 1.5%igen Agarosegel aufgetrennt (3-4 h, 30 V, bei 10 µg DNA pro Spur). Unter UV-Licht wird vor und hinter der zu eluierenden Bande mit einem Skalpell eingeschnitten und in die Schnitte ein genau passendes Stück Papier (SCHLEICHER & SCHÜLL DE 81) eingesetzt. Die Elektrophorese wird solange fortgesetzt, bis die DNA vollständig auf dem Papier gebunden hat (mehrmalige Kontrolle unter UV-Licht).

Das DE 81-Papier wird mit der Waschlösung 3mal gewaschen und dann portionsweise (100 µl) die DNA mit der Elutionslösung herausgelöst. Dieses Eluat wird durch Zugabe von 2.5 Vol. Ethanol gefällt, die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet.

2.2.4.5 Klonieren

2.2.4.5.1 Dephosphorylierung des Vektors pGEM 3

10x-CIP-Puffer (CIP - Alkaline Phosphatase aus Kälberdarm)

- 10 mM $MgCl_2$
- 1 mM $ZnCl_2$
- 10 mM Spermidin
- 0.5 M Tris/HCl pH 9.0

Die linearisierte Vektor-DNA (50 µg) wird nach der Ethanolfällung in 45 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) resuspendiert, 5 µl 10x-CIP-Puffer und 4 Einheiten Alkaline Phosphatase (CIP) zugesetzt und für 30 min bei 37° C inkubiert. Nach nochmaliger Zugabe von 4 Einheiten CIP und 30minütiger Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von Nitrilotriessigsäure (NaOH, pH 7.9, Endkonzentr. 20 mM) gestoppt. Der Reaktionsansatz wird mit gleichem Volumen TE-gesättigtem Phenol ausgeschüttelt und die wässrige Phase nochmals in Chloroform extrahiert. Nach Volumenbestimmung wird die wässrige Phase mit LiCl (Endkonzentration 0.1 M) und 2.5 Vol. Ethanol versetzt und so die DNA gefällt.

2.2.4.5.2 Kovalente Ligation

10x-Ligationspuffer

- 50 mM $MgCl_2$
- 50 mM DTT
- 10 mM ATP
- 660 mM Tris/HCl pH 7.6

- **T_4 -Ligase**

Verfahren nach WEISS et al., 1968: 200 ng linearisierter Vektor-DNA (pGEM 3) wird mit etwa 2 μg 200 bp-Fragment (pSSu) in Ligationspuffer für 10 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wird 2 h lang im Kühlschrank langsam abgekühlt (im Styropormantel) und nach Zugabe von 10 Einheiten T_4 -Ligase über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

2.2.4.5.3 Transformation

Ansatz

- 1 x ML-Medium (siehe unter 2.2.4.1)
- 0.1 M CaCl_2
- Stamm: E. coli DH 5

Die Wirtsbakterien wurden von einer stationären Übernachtskultur in 100 ml ML-Medium überimpft und bei einer OD_{600} von 0.6 geerntet.

Für die Präparation von kompetenten Zellen wurde das Pellet in eiskaltem 0.1 M CaCl_2 aufgenommen. Dieser Vorgang wurde 2 mal wiederholt. Bei dem letzten Schritt wird das Pellet (40 ml Kultur) in 1 ml 0.1 M CaCl_2 gelöst. 100 μl kompetente Zellen werden mit 80 μl 0.1 M CaCl_2 und 20 μl aus dem Ligationsansatz versetzt. Dann erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für 3 sec und, nach einer Abkühlung auf Eis, ein weiterer für 2 min.

Zu dem Ansatz wird 1 ml ML-Medium gegeben und für 1 h bei 37° C inkubiert (Expressionsphase). Die Bakterien (200 μl) werden auf Petrischalen mit 1.5%igem ML-Agar-Medium (das zur Selektion 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin enthält) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Identifizierung der in den Vektoren integrierten Fragmente wurde eine Plasmid-Präparation einzelner Klone durchgeführt, mit ausgewählten Restriktionsenzymen geschnitten und elektrophoretisch überprüft.

2.2.4.6 Sequenzieren

Doppelstrangsequenzierung nach SANGER et al., 1977

Denaturieren der Plasmid-DNA

- 3 M Na-acetat pH 5.2
- 2 M NH_4 -acetat pH 4.5
- Denaturisierungspuffer: 0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA (pH 8)

2 μg Plasmid-DNA werden in 40 μl Denaturisierungspuffer gelöst und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend mit NH_4 -acetat (Endkonzentration 0.2 M) und 2.5 Vol. EtOH versetzt und für 30 min bei 16000 g (A 8.24) pelletiert. Das DNA-pellet wird einmal mit 70% EtOH gewaschen, zentrifugiert (30 min, 16000 g, A 8.24) und 30 min an der Speedvac getrocknet.

Annealing

10 x Annealingpuffer :

- 100 mM Tris pH 8

- 50 mM $MgCl_2$
- SP 6-/ T_4 -Primer

Die DNA wird in 10 μ l H_2O bidest. gelöst und nach Zugabe von SP 6- respektive T_4 -Primer (20 pmol), 10 μ Ci α -32P-dATP und 10 x Annealingpuffer (1.5 μ l) für 15 min bei 37° C inkubiert.

Sequenzierungsreaktion

Ausgangskonzentrationen der Nukleotide: dNTP's 0.5 mM, ddNTP's 2.0 mM.
Endkonzentrationen (in μ M):

	dTTP	dGTP	dCTP	ddATP	ddTTP	ddGTP	ddCTP
A-Mix	100	100	100	125			
T-Mix	5	100	100		500		
G-Mix	100	20	100			500	
C-Mix	100	100	30				80

Formamide-Dye-Mix :

- 98% Formamid (w/w), deionisiert
- 10 mM EDTA pH 8
- 0.2% Bromphenolblau (w/v)
- 0.2% Xyleneblau (w/v)

Chase-Lösung :

- 0.125 mM dNTP

Der Annealingansatz wurde mit 4 U-Klenow-Polymerase versetzt, auf die vier dNTP/ddNTP - Gemische (s.o.) verteilt und für 15 min bei 30° C inkubiert. Nach Zugabe von 1 μ l Chase-Lösung wurde für weitere 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 μ l Formamide-Dye-Lösung gestoppt, 5 min auf 100° C erwärmt und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis stehengelassen.

Gelelektrophorese

Laufpuffer :

- 1 x TBE-Puffer

Die Glasplatten (20 x 40 cm) werden vor dem Gießen mit EtOH gewaschen und silanisiert (eine Seite mit Bind-Silan, eine Seite mit Repel-Silan). Es wird ein 6%-Polyacrylamid-/Harnstoffgel verwendet.

Ausgangslösung	
29% Acrylamid plus 1% Bisacrylamid	12 ml
Harnstoff	25 g
10 x TBE-Puffer	6 ml
H ₂ O	27 ml
TEMED	30 µl
10% APS	300 µl

Die Gele wurden für 30 min bei 24 mA vorelektrophoretisiert, nach Probenauftrag für etwa 2 h bei 25 mA laufengelassen. Nach dem Lauf wurden die Gele 15 min in 10%iger Essigsäure fixiert, 2 h bei 80° C getrocknet und anschließend autoradiographiert.

2.2.5 in vitro - Transkription im SP 6 - System

Verfahren nach KRIEG et MELTON, 1984.

- 5 x SP 6 - Puffer (200 mM Tris/HCl pH 7.6, 30 mM $MgCl_2$, 10 mM Spermidin)
- 10 mM A/U/CTP
- 2.5 mM GTP
- 5 mM GpppG
- 0.1 M DTT

Die Plasmid-DNA wurde mit EcoRI geschnitten, die Linearisierung über Agarosegelelektrophorese geprüft, die DNA in Ethanol gefällt und das Pellet in H₂O bidest. gelöst (1 µg/µl). Ein Kontrollansatz wurde mit α-32P-UTP ohne "cap"-Struktur durchgeführt. In einem 25 µl - SP 6-Polymeraseansatz wurden 4 µg linearisierte Plasmid-DNA in 1 x SP 6-Puffer mit 1 mM A/G/C/UTP, 5 µCi α-32P-UTP, 10 mM DTT und 20 Einheiten SP 6-Polymerase für 1 h bei 37° C inkubiert. Der Einbau von α-32P-UTP lag bei 93% und entsprach einer synthetisierten RNA von 31 µg.

Die Standardansätze für die in vitro-Translation wurden nicht mit α-32P-UTP markiert.

In einem 50 µl - Ansatz wurden 3 bis 4 µg linearisierte Plasmid-DNA in 1 x SP 6-Puffer mit 0.5 mM A/U/CTP, 0.05 mM GTP, 0.5 mM GpppG, 10 mM DTT, 25 Einheiten RNA-sin und 10 Einheiten SP 6-Polymerase für 1 h bei 37° C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz mit 50 µl TE-gesättigtem Phenol versetzt, die wässrige Phase nochmals mit Chloroform extrahiert und die RNA durch Zugabe von KCl (Endkonzentration 0.3 M) und 2.5 Vol. Ethanol gefällt, das RNA-Pellet in sterilem Aq. bidest. gelöst und so für die in vitro-Translation im Weizenkeimsystem verwendet.

2.2.6 in vitro - Translation im Weizenkeim - System

Poly-A -mRNA wurde im Weizenkeimsystem translatiert. Ein Standardansatz (100 μ l) enthielt 20 mM Hepes/KOH (Endkonzentration; pH 7.6), 100 mM KCl, 3.5 mM Mg-acetat, 1 mM ATP, 20 μ M GTP, 2 mM DTT, 8 mM Creatinphosphat, 25 μ M aller Aminosäuren außer Methionin, 4 μ g Creatinkinase, 100 μ Ci 35S-Methionin (spezifische Aktivität 800 Ci/mmol) und 4 bis 5 μ g Poly-A - RNA. Nach einer Inkubationszeit von eineinhalb Stunden bei 25°C (BARTLETT et al., 1982) wurde das Weizenkeimsystem für 50 min bei 140000 g (RP 65 T) abzentrifugiert. Der so gewonnene postribosomale Überstand wurde für nachfolgende Transportversuche eingesetzt.

In manchen Fällen wurde zur Entfernung von Triosephosphaten und Creatinphosphat der Überstand durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (52 mg pro 100 μ l) innerhalb von 30 min gefällt, für 30 min bei 140000 g abzentrifugiert, das Pellet in 50 mM Hepes/KOH (pH 8) aufgenommen und für drei Stunden gegen den selben Puffer dialysiert (Bild 3).

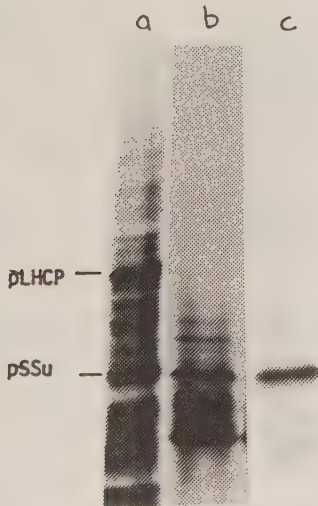


Bild 3. Vergleich der Translationsprodukte verschiedener mRNAs. Spur a: Translationsprodukte von polyA + mRNA aus Erhse (siehe 2.2.3.1), Spur b: Translationsprodukt von aufgereinigter polyA + mRNA nach Hybridisierung mit Plasmid-DNA von pSSu-160-clone (siehe 2.2.3.2). Spur c: Translationsprodukt von mRNA, synthetisiert im SP 6- Transkriptionssystem mit linearisiertem SSu-clone PSP 81/4 (siehe 2.2.5).

2.2.7 Aufnahmebedingungen für den Transport

In der Regel wurden Importansätze von 300 μ l im Wasserbad bei 25° C entweder im Dunkeln oder im Licht eines Diaprojektors für 30 min inkubiert. Ein Transportansatz enthielt 3 mM $MgSO_4$, 10 mM Methionin, 26 mM K-gluconat, 2% BSA, 330 mM Sorbit, 6.6 mM ATP (mit versuchsbedingten Änderungen), 50 mM Hepes/KOH (pH 8), 30 μ l des vorne beschriebenen postribosomalen Überstandes und entweder intakte Etioplasten (entsprechend etwa 1 mg Protein) oder Chloroplasten (entsprechend etwa 100 μ g Chlorophyll a). Die Chloroplastenansätze enthielten zusätzlich 10 mM $NaHCO_3$. Je nach Versuch wurden Inhibitoren oder Stimulatoren zugesetzt. Die Kontrollansätze enthielten jeweils die gleichen Volumina an Lösungsmittel (Ethanol oder Wasser).

Der Import wurde durch Pelletieren der Plastiden gestoppt (4°C und 12000 g für 4 min). Das Pellet wurde einmal mit Waschmedium gewaschen und nochmals zentrifugiert, anschließend die Plastiden mit 10 mM Tricin-KOH (pH 7.9) und 4 mM $MgCl_2$ auf Eis lysiert. Durch Zentrifugieren bei 12000 g für 5 min ließen sich eine lösliche und eine Membranfraktion (die sowohl Thylakoide als auch Envelope enthielt) voneinander trennen. Die weitere Analyse erfolgte über PAGE.

In den meisten Fällen wurden die Plastiden vor der Lyse mit Thermolysin behandelt, um so den proteaseresistenten Import in die Organellen zu zeigen. Der Transportansatz wurde durch ein 40%-Percollkissen für 5 min bei 3000 g zentrifugiert, in 50 mM Hepes-KOH (pH 8) und 0.33 M Sorbit aufgenommen und mit $CaCl_2$ (Endkonzentration 0.5 mM) und Thermolysin für 30 min bei 4°C inkubiert. Der Proteaseverdau wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt, anschließend zentrifugiert und gewaschen wie oben beschrieben (Waschlösungen enthielten zusätzlich 5 mM EDTA).

2.2.8 Polyacrylamidgelelektrophorese

2.2.8.1 Denaturierendes System

Die Proteine aus den Transportansätzen wurden auf einem 15 bis 7.5%igen Gradientengel nach DELEPELAIRE und CHUA, 1979, elektrophoretisch aufgetrennt.

Stammlösung

- Acrylamid 30%ig, Bisacrylamid 0.8%ig (w/v)
- 10% Ammoniumpersulfat
- 60% Saccharose

Trenngelpuffer

- 1.5 M Tris/HCl (pH 8.3)

Sammelgelpuffer

- 500 mM Tris/HCl (pH 6.8)

Elektrodenpuffer

- Kathode : 0.192 M Glycin, 25 mM Tris/HCl (pH 8.3), 0.1% (w/v) SDS, 1mM EDTA
- Anode : 0.192 M Glycin, 25 mM Tris/HCl (pH 8.3)

Herstellen eines 1.5 mm dicken Gradientengels

Mit Hilfe eines Gradientenmischers wird ein Gel mit einem linearen Acrylamidgradienten (Tabelle 1) gegossen. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist, wird das Sammelgel (Tabelle 1) eingefüllt. Durch Einsetzen eines vorgeformten Kammes werden die späteren Auftragsspalten ausgespart.

Tabelle 1: Herstellung des Gradientengels

	Sammelgel	Trenngel	
	5%	7.5%	15%
30% (w/v) Acrylamid, 0.8%(w/v) Bisacrylamid	1.6 ml	3.75 ml	7.5 ml
60% (w/v) Sucrose		1.3 ml	3.75 ml
1.5 M Tris/HCl pH 8.8		3.75 ml	3.75 ml
0.5 M Tris/HCl pH 6.8	2.5 ml		
H ₂ O bidest.	5.8 ml	6.2 ml	
TEMED	5 µl	11.25 µl	6.25 µl
10% (w/v) APS	7.5 µl	37.5 µl	37.5 µl

Solubilisierungspuffer

- Stammlösungen von 500 mM Na_2CO_3 , 1 M DTT, 60% (w/v) Saccharose, 5% LDS plus 30% Saccharose plus 0.1% Bromphenolblau.
- Endkonzentrationen im verwendeten Solubilisierungsgemisch (1.2 ml): 62 mM Na_2CO_3 , 75 mM DTT, 0.6% SDS, 15%(w/v) Saccharose, 0.01% Bromphenolblau.

Färbelösung

- 0.175% (w/v) Serva Blau R 250
- 50% (v/v) Methanol
- 7% (v/v) Eisessig
- 43% (v/v) Aq. dest.

Entfärbelösung

- 40% (v/v) Methanol
- 7% (v/v) Eisessig
- 53% (v/v) Aq. dest.

Die Proben werden mit Solubilisierungspuffer versetzt, 1 min gekocht, auf das Gel aufgetragen und über Nacht bei einem konstanten Strom von 14 mA getrennt. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel etwa eine Stunde an- und einige Stunden entfärbt.

2.2.8.2 Nicht denaturierendes System

Die nicht-denaturierenden Gele wurden nach SMITH et ELLIS, 1984, hergestellt (Tabelle 2):

Tabelle 2: Herstellung der nicht denaturierenden Gele

	Sammelgel	Trenngel	
	5%	5%	10%
20% Acrylamid, 0.4% Bisacrylamid	1.25 ml	1.25 ml	2.5 ml
60% Sucrose		0.4 ml	1.25 ml
1.5 M Tris/HCl pH 8.8		1.25 ml	1.25 ml
0.5 M Tris/HCl pH 6.8	2.5 ml		
H ₂ O bidest.	6.25 ml	2.09 ml	
TEMED		5.6 µl	2.8 µl
APS		19 µl	19 µl

Nach der Polymerisation des Trenngels wurden die Glasplatten um 90 Grad gedreht und erst dann das Obergel eingefüllt. Der Gradient verlief dadurch von links (5%) nach rechts (10%). Sämtliche Lösungen entsprachen denen für die denaturierenden Gele, außer daß kein Detergens verwendet wurde.

2.2.8.3 Fluorographie und Autoradiographie

Fluorographie der SDS - Gele nach BONNER und LASKEY, 1974 :

Nach dem Entfärben wurden die Gele in DMSO (zweimal 30 min) entwässert und für mindestens drei Stunden in 22% PPO in DMSO inkubiert. Danach wurden die Gele bis zum Erreichen ihrer ursprünglichen Größe gewässert (etwa 30 min) und anschließend zwischen Einmachfolie zwei Stunden mit einem Gelrockner bei 80° C getrocknet.

Autoradiographie :

Auf die getrockneten Gele wurde ein Röntgenfilm (Kodak Diagnostic XOMat) und eine Verstärkerfolie (Agfa - Gevaert MR 600 oder MR 800) gelegt und bei -80°C exponiert.

2.2.9 Quantifizierung des Imports

Durch die Autoradiographie konnten pSSU und SSU genau auf dem Gel lokalisiert werden. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Wasser rehydriert und in einem 30%igen H₂O₂ -/ 0.2 M NH₃- Gemisch bei 37° C über 48 Stunden aufgelöst. Nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit (ZINSSER Rotizint 22, FRG) konnte die Aktivität in einem Szintillationszähler (KONTRON Betamatic)

quantitativ bestimmt werden. Die spezifische Aktivität der SSU wurde anhand der veröffentlichten Sequenz berechnet (CORUZZI et al., 1983).

2.2.10 Immunoblot

Methode nach JOHNSON et al., 1984 und KNECHT et DIMOND, 1984. Die löslichen Überstände werden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet.

1. Nitrocellulose
2. anti rabbit-IgG/alk. Phosphatase
3. 5-Bromo-4-Chloro-3-indoxylphosphat-p-toluidin
4. Blotpuffer

- 192 mM Glycin
- 20 mM Tris
- 0.025% SDS

5. Caseinpuffer

- 100 mM Tris/HCl pH 7.5
- 150 mM NaCl
- 0.3% Casein

6. Färbelösung

- 730 mM Tris/HCl pH 9.75
- 5-Bromo-4-Chloro-3-indoxylphosphat-p-toluidin(in wenig DMSO gelöst; Endkonzentration 0.5 mg/ml)

Im bekannten sandwich-Verfahren werden Gel und Nitrocellulose (letztere zur Kathode hin orientiert) aufeinandergelegt und für 3 h bei 150 mA geblottet. Anschließend erfolgt das Absättigen der Nitrocellulose mit Caseinpuffer für 3 mal 15 min bei Raumtemperatur.

Die Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper (Verdünnung wurde jeweils beim Spezifitätstest der Antikörper ermittelt) erfolgte 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Die Nitrocellulose wurde dafür in eine Plastiktüte eingeschweißt, um das Inkubationsvolumen möglichst gering zu halten.

Nach der Inkubation wurde die Nitrocellulose 3 mal für jeweils 15 min mit Caseinpuffer gewaschen. Anschließend wurde mit anti rabbit-IgG/alk. Phosphatase (1:1000 mit Caseinpuffer verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und ebenfalls 3 mal für je 15 min mit Caseinpuffer gewaschen. Bei der nunmehr erfolgenden Färbung (siehe Färbelösung) wurden blaue Banden nach etwa 15 min sichtbar.

2.2.11 Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach der Methode von ARNON, 1949.

2.2.12 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY et al., 1957.

3. Ergebnisse

3.1 Proteintransport in intakte, gereinigte Erbsenetioplasten

Die Chloroplastenentwicklung höherer Pflanzen ist lichtreguliert. Im Dunkeln angezogene Pflanzen entwickeln eine spezielle Form von Plastiden, die Etioplasten. Diese können sich unter dem Einfluß von Licht in vollentwickelte Chloroplasten umwandeln.

Einige Arbeiten beschreiben die Veränderungen unter dem Einfluß des Lichts auf transkriptionaler Ebene, z.B. die Zunahme translatierbarer mRNA (HARPSTER und APEL, 1985). Die Veränderungen auf translationaler und posttranslationaler Ebene sind dagegen sehr schwach dokumentiert. Die Entwicklung von Etioplasten zu Chloroplasten beinhaltet aber einen erheblichen Proteintransport vom Cytoplasma in den Plastiden. Zu Beginn dieser Arbeit war ausschließlich der Chloroplast das Untersuchungsobjekt für Proteintransport.

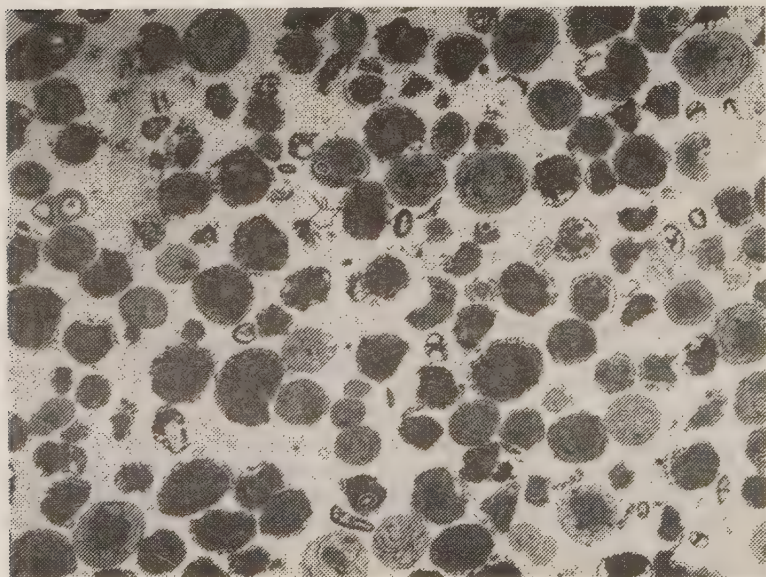


Bild 4. Elektronenmikroskopische Aufnahme von intakten, gereinigten Etioplasten . Vergrößerung 3600fach.

In unserem Labor wurde nun eine Methode entwickelt, intakte Erbsenetioplasten zu isolieren (SCHINDLER et SOLL, 1986, SCHULZE, Diplomarbeit, 1986). Somit war

es zum ersten Mal möglich, den Transport von kern-codierten Proteinen an Etioplasten zu untersuchen.

Die Ausbeute von intakten, gereinigten Etioplasten wurde zum Einen über Phasenkontrastmikroskopie geprüft (Bild 4) und lag bei 95%, zum Anderen über Dichtebestimmung der LSu von Etioplasten, die in Puffern unterschiedlicher Osmolarität resuspendiert waren. Hier betrug sie > 80% (Bild 5).

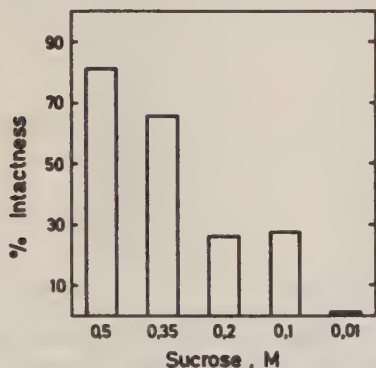


Bild 5. "latency" stromaler Proteine am Beispiel der großen Untereinheit . Etioplasten wurden in Puffern unterschiedlicher Osmolarität resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Der im Überstand auftretende Prozentsatz an LSu wurde, wie vorne beschrieben, bestimmt.

Die Reinheit der Etioplasten wurde mittels Markerenzymen überprüft. Tabelle 3 zeigt die Verteilung der Markerenzyme: Cytochrom-c-oxidase als Leitenzym für Mitochondrien und Hydroxy-Pyruvatreduktase als Leitenzym für Peroxisomen.

Tabelle 3: Reinheit der Erbsenetioplasten

Fraktion	Vol.	Cytochrom-c-oxidase Gesamtaktivität		Hydroxypyruvatreduktase Gesamtaktivität	
		$\mu\text{mol/min}$	$\mu\text{mol/mg min}$	$\mu\text{mol/min}$	$\mu\text{mol/mg min}$
1	10 ml	2745	25.3	2.42	0.022
2	2 ml	1220	36.0	0.66	0.0197
3	4 ml	1028	33.2	0.51	0.0166
4	1 ml	6.4	0.74	0.005	0.0006

1 - rohes pellet, 2 - obere Schicht des Percoll-Gradienten,
3 - aufgebrochene Etioplasten, 4 - gereinigte, intakte Etioplasten

Die Ausbeute intakter, gereinigter Etioplasten lag somit bei 30 und 40 mg Protein/100 g Frischgewicht und war derjenigen von Erbsenchloroplasten (25 bis 45 mg/100 g Frischgewicht) vergleichbar.

Die Aufnahme von pSSu in Etioplasten wurde in einem *in vitro* - System untersucht. Die Versuche wurden im Dunkeln und in Gegenwart von ATP durchgeführt. Bild 6 zeigt einen Vergleich des Proteintransports von Etioplasten und Chloroplasten; Spur a , b ist dabei die Aufnahme von pSSu und Prozessierung zum reifen Protein.

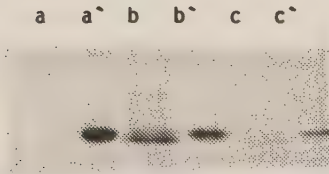


Bild 6. Autoradiogramm von Transport und Prozessierung von pSSu . Im Transportversuch wurden intakte Chloroplasten (entsprechend 150 μ g Chlorophyll, Spur a und a') und intakte Etioplasten (entsprechend 960 μ g Protein, Spur b und b') mit *in vitro*-Translationsprodukten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Plastiden in eine Membranfraktion (Spur a - c) und eine lösliche Fraktion (Spur a' - c') getrennt. Die Etioplasten wurden mit Thermolysin behandelt, um den proteaseresistenten Import zu testen (Spur c und c').

In beiden Fällen weist die prozessierte Form ein Molekulargewicht von 14000 auf, während pSSu ein Molekulargewicht von 20000 besitzt.

Um die Auswertung der Versuche zu vereinfachen, wurden die Etioplasten nach dem Transportexperiment in eine Membranfraktion und eine lösliche Fraktion getrennt. Der lösliche Überstand enthält die Stromaproteine der Plastiden und die prozessierte Form, SSu. Die Membranfraktion besteht bei Chloroplasten aus Thylakoiden, bei Etioplasten aus Prolamellarkörpern und Prothylakoiden. Zusätzlich enthält sie bei beiden Plastidensorten die Hüllmembranen, die mittels spezifischer Rezeptorproteine pSSu binden (PFISTERER et al., 1982 und CLINE et al., 1985).

Der Versuch zeigte, daß Etioplasten in der Lage sind, pSSu zu binden - nur wenige Proteine werden überhaupt gebunden -, zu transportieren und zu prozessieren. SSu war mit über 80% das Hauptprotein, das radioaktiv markiert im löslichen Überstand gefunden wurde (Bild 7).

Um den Import zu verifizieren, wurden die Etioplasten mit Protease behandelt. Dementsprechend findet man kein gebundenes Vorstufenprotein an der Membran wieder, aber die reife Form (SSu) in der löslichen Fraktion (Bild 6, Spur c). Dies zeigt, daß SSu sich im Inneren des Plastiden befunden haben muß. Zwischen 20 und 35% der im Transportansatz vorhandenen radioaktiv markierten Vorstufe findet man nach dem Transportexperiment im Etioplasten wieder.

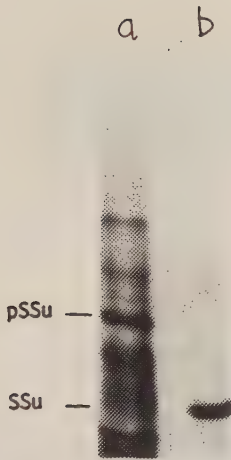


Bild 7. Vergleich der angebotenen Vorstufen mit den aufgenommenen Proteinen . Etioplasten; Spur a: Autoradiogramm von Translationsprodukten im posttranslationalen Überstand (entsprechend 10 μ l). Spur b: Autoradiogramm der löslichen Etioplastenfraktion nach Inkubation mit Translationsprodukten (entsprechend 30 μ l).

Vergleicht man den Proteintransport in Etioplasten und Chloroplasten und wählt man die Proteinkonzentration als Vergleichsgrundlage, so findet man Transportraten von:

Etioplasten	5.6 · 10 ⁶ Moleküle SSu pro μ g Protein und Stunde
Chloroplasten	3.0 · 10 ⁶ " " " "

Die Etioplasten arbeiten also fast zweimal so effizient, wobei man aber auch die Plastidengröße nicht außer Acht lassen darf (Etioplasten sind in der Regel um einen Faktor 2 kleiner als die Chloroplasten).

Die Kinetik des Transports (Bild 8, Spur b) zeigt, daß schon nach drei Minuten prozessierte Form nachzuweisen ist. Die Transportrate bleibt für weitere 30 Minuten linear und geht dann zurück. 30 Minuten wurde als Standard-Inkubationszeit gewählt. Untersuchungen an Erbsen- und Spinatchloroplasten zeigen, daß zugesetztes exogenes ATP den Import von Vorstufenproteinen unterstützen kann (GROSSMAN et al., 1980 und CLINE et al., 1985). Vergleichbare Ergebnisse erhält man für Etioplasten (Bild 9, Spur a , b).

Um unter genau definierten Bedingungen zu arbeiten, wurde der posttranslationale Überstand des Translationsansatzes mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällt, um so ATP, GTP und andere energiereiche Phosphatverbindungen wie Creatinphosphat, die im Weizenkeimsystem vorliegen, zu entfernen. Danach wurde ausreichend dialysiert, um die hohe Salzkonzentration zu senken.

Verschiedene ATP-Konzentrationen wurden dann zum Transportansatz gegeben und der Effekt auf den Import beobachtet (Bild 10, Spur a - c). Man findet eine deutliche ATP-Abhängigkeit: steigende Konzentration von ATP erhöht den Import; die Beziehung ist im getesteten Konzentrationsbereich allerdings nicht linear.

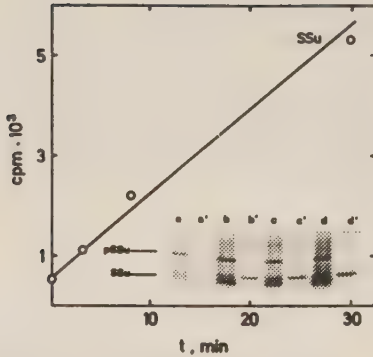


Bild 8. Kinetik des Proteintransports in intakte, gereinigte Erbsenetioplasten. Transportansatz mit Etioplasten (entsprechend 880 μg Protein) wurde zu bestimmten Zeiten (0, 3, 8, 30 min, Spur a - d) gestoppt, um die Transportrate zu bestimmen. Danach wurde in eine Membran- (Spur a - d) und eine lösliche Fraktion (Spur a' - d') getrennt, um Bindung und Import zu untersuchen. Die Proben wurden über SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie analysiert. Eine quantitative Bestimmung der Radioaktivität erfolgte über Scintillationsmessung.

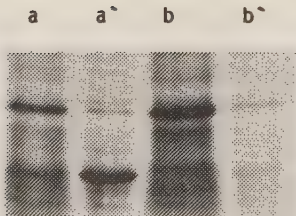
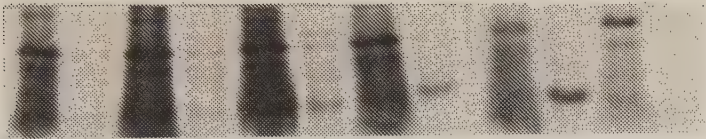


Bild 9. Autoradiogramm des ATP-abhängigen Transports von pSSu in Etioplasten. Intakte Erbsenetioplasten (entsprechend 1.2 mg) wurden mit in vitro-Translationsprodukten in Gegenwart von exogen zugegebenem ATP (6.6 mM, Spur a und a') und in dessen Abwesenheit (Spur b und b') inkubiert. ATP- und GTP-Konzentrationen in Spur b und b' liegen bei ungefähr 0.1 mM (durch Translationsmix).

Werden intakte Etioplasten mit nicht ammoniumsulfat-gefällten Transportansätzen in Gegenwart von 0.1, 0.6, 2.0 und 6.7 mM ATP inkubiert, so findet man entsprechend $1.3, 3.4, 5.8$ und $8.8 \cdot 10^6$ transportierte Moleküle SSu pro μg Protein und Stunde in der löslichen Etioplastenfraktion. Die Transportraten waren bei ammoniumsulfat-gefällten Translationsproben immer geringer, was vielleicht mit Konformationsänderungen der Vorstufenproteine durch die Fällung erklärt werden kann.

a a' b b' c c' d d' e e' f f'



TRANSPORT

(Moleküle /

$\mu\text{g Protein} \times \text{h})$

$\times 10^4$

- 1.3 3.4 5.8 8.8 -

Bild 10. Autoradiogramm des ATP-abhängigen Transports von pSSu in Etioplasten. Um die Rolle des ATP zu verdeutlichen, wurden Erbsenetioplasten mit Ammoniumsulfat-gefällten Translationsprodukten und unterschiedlichen ATP-Konzentrationen (0, 0.1, 0.3, 0.6 und 2.0 mM ATP, Spur a - e) im Dunkeln inkubiert. Spur f und f' zeigt Proteintransport von Etioplasten im Licht ohne ATP.

Chloroplasten sind im Licht ohne exogenes ATP in der Lage, pSSu zu transportieren und zu prozessieren; Etioplasten dagegen nicht (Bild 10, Spur f).

Eine drastische Inhibierung des Transportes von pSSu findet man durch Zugabe von NaF (bekannt als Phosphatase-Inhibitor, TORRIANI, 1968). Bei einer Konzentration von 20 mM NaF ist eine deutliche Abnahme von SSu zu sehen, ans Envelope gebundene pSSu nimmt entsprechend zu (Bild 11, Bild 12). Eine Steigerung der NaF-Konzentration bis 70 mM bringt den Import völlig zum Erliegen.

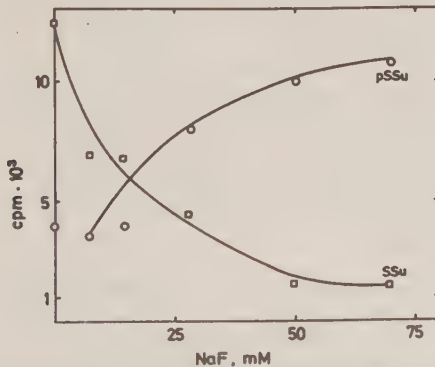


Bild 11. Hemmung des Proteintransports durch NaF. Intakte Etioplasten (entsprechend 810 μg) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaF inkubiert. pSSu- und SSu-Banden wurden nach der Autoradiographie ausgeschnitten und, wie vorne beschrieben, weiterbehandelt.

Die Transportversuche zeigen, daß das Vorstufenprotein für die Kleine Untereinheit in den Etioplasten transportiert und zum reifen Protein prozessiert wird. Daran schließt sich der Zusammenbau von Kleinen Untereinheiten mit Großen Unterein-

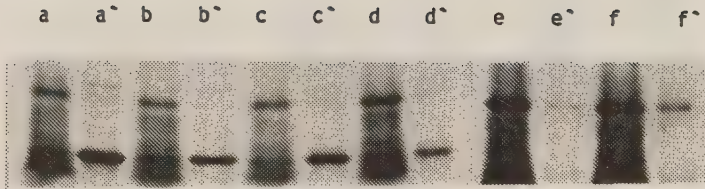


Bild 12. Autoradiogramm zur Hemmung des Proteintransports durch NaF. Intakte Etioplasten (entsprechend 810 μ g) wurden mit unterschiedlichen NaF-Konzentrationen (0, 7, 14, 28, 50 und 70 mM, Spur a - f) inkubiert und wiederum in eine Membran- (Spur a - f) und eine lösliche Fraktion (Spur a' - f') aufgetrennt.

heiten der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase an. Letztere liegen im Dunkeln im Etioplasten bereits vor. Die Große Untereinheit trägt das katalytische Zentrum. Die Aufgabe der Kleinen Untereinheit ist noch nicht geklärt, aber für die Enzymaktivität von essentieller Bedeutung (ELLIS, 1977). Es galt nun zu zeigen, daß ein solcher Zusammenbau von Kleinen und Großen Untereinheiten zum Holoenzym nach einem Transportversuch im Stroma des Etioplasten erfolgte. Nach KIRK et TILNEY-BASSET, 1978, besitzt das im Chloroplastenstroma gefundene Holoenzym ein Molekulargewicht von etwa 560 kD.

Westernblot-Analysen von Etioplasten- und Chloroplastenstroma zeigten, daß sowohl LSu als auch SSu in Chloroplasten, aber nur LSu in Etioplasten nachweisbar war (Bild 13A). Nach Auftrennung von Etioplastenstroma in einem nicht denaturierenden System war hauptsächlich eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 500000 durch Coomassie blue - Färbung nachzuweisen (Bild 13B). Mit einem Teil des Gels wurde nochmals ein Westernblot durchgeführt, und die Bande mit dem Molekulargewicht von 500000 zeigte eine positive Reaktion bei der Inkubation mit dem Antikörper gegen die Große Untereinheit (Bild 13C). Anschließend wurde die lösliche Etioplastenfraktion eines Transportansatzes wieder über ein nicht denaturierendes System getrennt, die nach Anfärben als Carboxylase identifizierte Bande ausgeschnitten und in einem denaturierenden System aufgetrennt. Auf diese Weise konnte der Anteil von SSu bestimmt werden, der an die höhermolekulare oligomere Form gebunden war.

Das Autoradiogramm eines nicht denaturierenden Gels zeigt, daß nach 0 Min eines Transportexperiments keine Radioaktivität in der 500 kD - Form nachzuweisen ist. Nach 30 Min findet man dagegen Markierung (Bild 13C; Spur a, b). Wenn diese markierte Bande aus dem nicht denaturierenden Gel ausgeschnitten und in einem denaturierenden System aufgetrennt wird, findet man Radioaktivität in einer Bande mit dem Molekulargewicht 14000, entsprechend der prozessierten SSu (Bild 13C; Spur c). Ein Parallelversuch mit Chloroplasten zeigt das gleiche Ergebnis (Bild 13C; Spur d).

Eine Quantifizierung der transportierten, mit der höhermolekularen oligomeren Form assoziierten SSu war ebenfalls möglich. Mindestens 30% (Bild 13C; Spur f) der ge-

samten transportierten SSu (Bild 13C; Spur e) findet man in der oligomeren Form der Carboxylase.

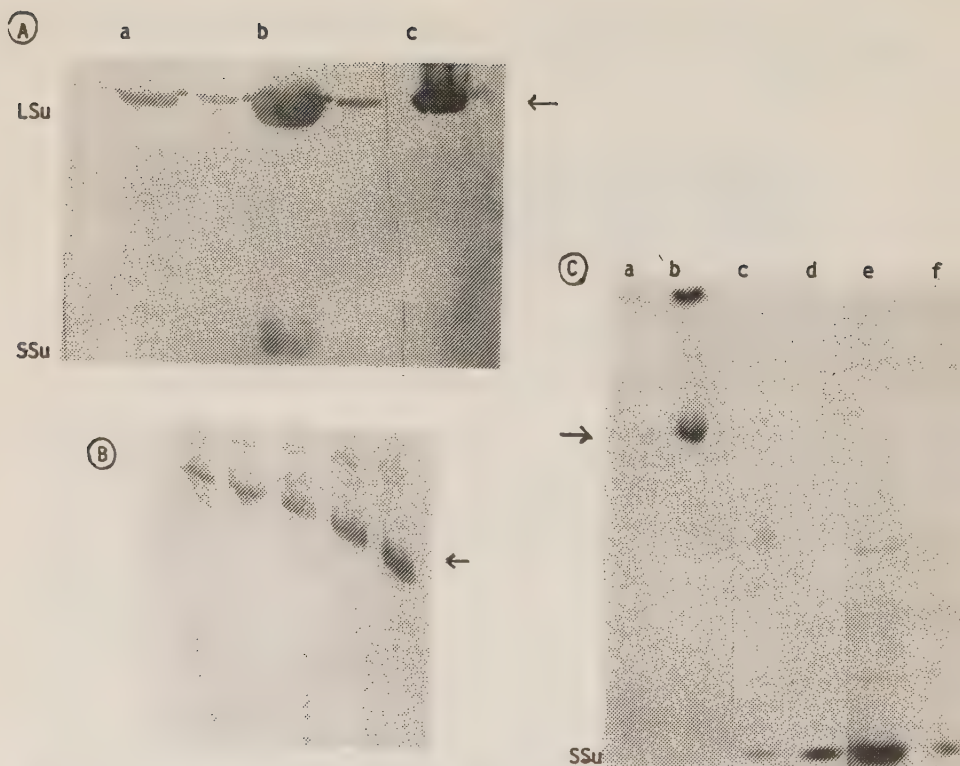


Bild 13. Zusammenbau von transportiertem Vorstufenprotein und LSu im Etioplasten. **Bild A:** Westernblotanalyse von Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase in Etioplasten (Spur a) und Chloroplasten (Spur b) über SDS-PAGE. Spur c zeigt die Analyse einer nicht denaturierenden PAGE (in Bild B von Etioplasten; Pfeil deutet auf die Position des höhermolekularen Oligomers nach einer nicht-denaturierenden PAGE in A, B und C). **Bild B:** Nicht-denaturierende Gradientengelelektrophorese löslicher Etioplastenproteine nach Transport. Die Abbildung zeigt das Proteinmuster nach einer Coomassie-blau-Färbung. Der Gradient verläuft horizontal (rechte Seite 5%, linke Seite 10%). Die höhermolekulare Form ($\rightarrow$) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in einer SDS-PAGE aufgetrennt, um die Untereinheiten voneinander zu isolieren. **Bild C:** Autoradiogramm einer nicht-denaturierenden PAGE nach 0 und 30 min (Spur a und b). Die Spuren c und d zeigen ein Autoradiogramm nach zusätzlicher SDS-PAGE des pSSu-Transports und Assemblierung in Etio- und Chloroplasten. Spur e zeigt ein Autoradiogramm von SSu nach Transport und SDS-PAGE. Im Vergleich dazu zeigt Spur f ein Autoradiogramm nach Transport, aufgetrennt in erster Dimension unter nicht-denaturierenden Bedingungen und in zweiter nach SDS-PAGE. Die Radioaktivität in Spur f repräsentiert den Anteil, der nach dem Transport mit der LSu assoziiert war.

3.2 Proteintransport in intakte, gereinigte Erbsenchloroplasten

Der Transport von kern-codierten, im Cytoplasma synthetisierten Proteinen läßt sich in drei Abschnitte einteilen:

- Binden der Vorstufenproteine an die Hüllmembran
- Translocation
- Prozessierung zum reifen Protein
- Assemblierung zu Holokomplexen

Das Binden der Vorstufenproteine ans Envelope läßt sich gut zeigen unter Bedingungen, die den Import hemmen (CLINE et al., 1985). Das Binden ist energieunabhängig und spezifisch für Vorstufenproteine (Bild 14). Reife Proteine binden nicht (PFISTERER et al., 1982).

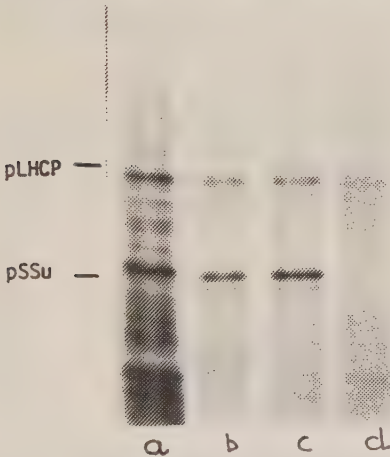


Bild 14. Bindungstest von Vorstufenproteinen . Vorstufenproteine aus dem posttranslationalen Überstand (Spur a, 10 μ l). Envelopevesikel (entsprechend 10 μ g Protein) wurden mit 10 μ l posttranslationalem Überstand für 30 min bei 25° C ohne (Spur b) und mit ATP (6.6 mM, Spur c) inkubiert und danach bei 4°C für 30 min bei 100000 g pelletiert. Spur d entspricht dem Überstand (d.h. nicht gebundene Proteine).

Die Translocation - der eigentliche Durchtritt der Proteine durch die Hüllmembran - ist ein energieabhängiger Schritt sowohl in Mitochondrien als auch in E. coli und Chloroplasten. Für Mitochondrien ist geklärt, daß das Membranpotential über der inneren Membran die eigentliche Energiequelle ist (PFANNER, 1985). Neueste Arbeiten (PFANNER et NEUPERT, 1986) zeigen, daß zusätzlich zu dem Membranpotential über der inneren Membran Nukleosidtriphosphate benötigt werden. Für Chloroplasten, die zu Beginn der Arbeit sehr viel schlechter untersucht waren, wurde ein ATP-Bedarf beschrieben (GROSSMAN et al., 1979). Unter Bedingungen, die die ATP-Synthese im Inneren des Chloroplasten unterbinden, kann der Import durch Zugabe von exogenem ATP aufrecht erhalten werden (CLINE et al., 1985). Es blieb jedoch unklar, ob molekulares ATP oder nicht doch ein Membranpotential

eine Rolle bei der Translocation spielt. In letzter Zeit wurde eine ATP-abhängige Proteintranslocation in Membranvesikel von *E. coli* (CHEN et TAI, 1985) und durch mikrosomale Membranen bei Hefe (ROTHBLATT et MEYER und WATERS et BLOBEL, 1986) nachgewiesen.

Für die Versuche zum Energieaspekt des Proteinimports wurden die Translationsproben mit Ammoniumsulfat gefällt. Die Transportrate war somit geringer als die bei den Etioplastenversuchen beobachteten und lag bei 10^5 bis 10^6 Molekülen SSu pro μg Protein und Stunde. Es traten auch größere Schwankungen auf, die teilweise dadurch zu erklären sind, daß unterschiedliche mRNA-Präparationen und Chloroplasten von Erbsen unterschiedlichen Alters (d.h. 10 bis 14 Tage) verwendet wurden. Wurden die Proben zusätzlich nach dem Transport thermolysin-verdaut, so war die berechnete Transportrate geringer, wobei zu erwähnen ist, daß der Verlust an Chloroplasten durch die Proteasebehandlung aus versuchstechnischen Gründen nicht berücksichtigt wurde und weiterhin die Bezugsgröße ($100 \mu\text{g}$ Chlorophyll) herangezogen wurde und somit die eigentliche Transportrate verfälschte.

Die Hydrolyse von ATP ist für die Translocation von pSSu durch die Hüllmembran notwendig. Ersetzt man ATP durch nicht hydrolysierbare Analoge wie AMP-PNP und AMP-PCP, erfolgt kein Proteintransport (Bild 15). In Gegenwart von ATP (6.6 mM) verzeichnet man wieder die üblichen Transportraten.

ATP	-	6.6	-	6.6	-	6.6
AMP-PNP	-	-	6.6	6.6	-	-
AMP-PCP	-	-	-	-	6.6	6.6



Bild 15. Proteintranslocation in Chloroplasten benötigt ATP-Hydrolyse. Chloroplasten wurden mit ammoniumsulfat-gefällten Translationsprodukten und mit ATP, respektive ATP-Analogen (mM) inkubiert, die lösliche Fraktion über Autoradiographie analysiert.

ATP (6.6 mM) kann die Wirkung von AMP-PNP nicht vollständig kompensieren. Eine Abnahme des Imports von pSSu ist weiterhin zu beobachten. Bei geringeren AMP-PNP - Konzentrationen (bis 2 mM) ist die pSSu-Translocation dagegen durch ATP (6.6 mM) wieder vollständig herstellbar (Tabelle 4).

Die anderen Triosephosphate GTP, CTP und UTP (6.6 mM) konnten weder in Etioplasten noch in Chloroplasten als Energiequelle für die pSSu - Translocation benutzt werden.

Die Pflanzenzelle ist in vivo in der Lage, ATP auf mehreren Synthesewegen zu gewinnen, zum Einen über die Photosynthese (nicht-zyklische oder zyklische Photophosphorylierung), zum Anderen über Stärkeabbau oder Glykolyse, wobei verschiedene Enzymsysteme beteiligt sind. Die letzteren Reaktionen können durch Zugabe von bekannten, standardisierten Enzymen und entsprechenden Substraten in vitro nachgeahmt werden, wobei man in der Lage ist, ATP sowohl außerhalb als auch innerhalb des Chloroplasten zu synthetisieren.

Tabelle 4: Proteinimport von pSSu in Chloroplasten in Gegenwart von ATP-Analogen.

Behandlung	(mM)	Transport (Moleküle / μg Protein * h)
ATP		$7.2 \cdot 10^4$
AMP-PNP	1	$5.3 \cdot 10^3$
	3	$6.1 \cdot 10^3$
	6.6	$6.2 \cdot 10^3$
ATP + AMP-PNP	1	$7.1 \cdot 10^4$
	3	$1.2 \cdot 10^4$
	6.6	$6.3 \cdot 10^3$
ATP + AMP-PCP	6.6	$7.1 \cdot 10^4$

ATP-synthetisierende Systeme wie Pyruvatkinase, Phosphoenolpyruvat (PEP) und ATP können exogen zugesetztes ATP ersetzen, d.h. ATP wird während des Transportvorgangs im Ansatz außerhalb des Chloroplasten zur Verfügung gestellt. Wird kein ATP zugesetzt, ist PEP nicht in der Lage, die pSSu - Translocation voranzutreiben (Bild 16).

ATP	6.6	-	-	-	-	-
PEP	-	5	5	-	-	-
ADP	-	-	3	-	-	-
OAA	-	-	-	1	-	1
DHAP	-	-	-	-	1	1
P _i	-	-	-	-	-	10



Bild 16. Test verschiedener ATP-Quellen. Der Transport von pSSu kann ATP verwenden, das innerhalb oder außerhalb des Chloroplasten synthetisiert wird. Synthese außerhalb: Zugabe von Phosphoenolpyruvat, ADP (mM) und Pyruvatkinase (1.5 Einheiten). Synthese innerhalb: Zugabe von Oxalacetat, Dihydroxyacetonphosphat und P_i(mM).

Um zu sehen, ob im Chloroplasten synthetisiertes ATP ebenfalls den Proteinimport positiv beeinflussen kann, wurden die Chloroplasten im Dunkeln mit Oxalacetat (OAA) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) vor dem Transport inkubiert. Diese Substrate werden über spezifische carrier in den Chloroplasten transportiert (HATCH et al., 1984) und können im Inneren zur ATP-Synthese dienen.

ATP, das im Inneren des Chloroplasten synthetisiert wird, kann die Translocation von Vorstufenproteinen unterstützen (Bild 16). Der Einfluß der an der inneren Hüllmembran gebundenen ATPase im energieabhängigen Schritt des Proteintransports ist ungeklärt (NGUYEN et SIEGENTHALER, 1983). Spezifische Inhibitoren der ATPase wie Na_3VO_4 , $LaCl_3$ und $SbCl_3$ zeigen ebenfalls einen Einfluß auf den Proteintransport, allerdings wirkt Na_3VO_4 , das nach NGUYEN und SIEGENTHALER die ATPase am wirkungsvollsten hemmt, am schwächsten auf den Import von pSSu (Tabelle 5). GTP und CTP sind ebenfalls Substrate der envelope-gebundenen ATPase, werden mit ähnlichen Raten hydrolysiert (McCARTY et SELMAN, 1986), können aber den Proteintransport nicht unterstützen.

Tabelle 5: Einfluß von ATPase-Inhibitoren auf den Proteinimport in Chloroplasten.

Inhibitor	(mM)	Inhibition(%)	
		Proteinimport	ATPase *
Na_3VO_4	0.1	38	98
$SbCl_3$	1	51	50
$LaCl_3$	1	20	50

ATPase ans Chloroplastenenvolpe gebunden. *) Daten nach NGUYEN et SIEGENTHALER, 1983.

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß für den Proteintransport ATP notwendig ist. Es lassen sich jedoch keine Schlüsse daraus ziehen, an welcher Seite der Hüllmembran der Bedarf besteht. Folgender Versuch sollte darüber Klarheit schaffen: ATP wurde im Inneren des Chloroplasten durch OAA/DHAP synthetisiert und gleichzeitig Glucose sowie steigende Konzentrationen von Hexokinase zugesetzt.

HEXOKINASE - - 1.7 2.3 7 14



Bild 17. Einfluß von Hexokinase auf den Transport von pSSu. Im Chloroplasten synthetisiertes ATP wird durch exogen zugesetzte Hexokinase abgebaut. Chloroplasten (entsprechend 150 µg Chlorophyll) wurden im Dunkeln mit OAA/DHAP (1 mM) und steigenden Konzentrationen Hexokinase (in Einheiten, mit 5 mM Glucose) inkubiert (linke Spur als Kontrolle ohne Zusätze). Das Autoradiogramm zeigt die löslichen Fraktionen.

Hexokinase kann das ATP abbauen, das vom Inneren des Chloroplasten durch die Hüllmembran nach außen transportiert wird. Es sollte sich also ein Einfluß auf den ATP-abhängigen Transport zeigen, falls ATP an der äußeren (cytoplasmatischen) Seite der Hüllmembran benötigt wird. Wie Bild 17 zeigt, bringen steigende Konzentrationen an Hexokinase den Transport völlig zum Erliegen.

Es ist also offensichtlich, daß ATP, das im Inneren des Chloroplasten hergestellt und nach außen ins Cytoplasma transportiert wird, als Energiequelle für die Translocation von Vorstufenproteinen dient.

Ein weiteres Enzym, das ATP im extrachloroplastischen Raum hydrolysiert, aber keinen Einfluß auf den internen ATP-Spiegel im Chloroplasten hat, ist die alkaline Phosphatase. Eine Vorinkubation des Transportansatzes mit alkaliner Phosphatase bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen bringt den Import zum Erliegen (Bild 18).

ATP	6.6	6.6	6.6	0.5	0.5
alk.Phosphatase	-	11	22	8	16



Bild 18. Hemmung des Proteintransportes durch alkaline Phosphatase . Chloroplasten (entsprechend 150 µg Chlorophyll) werden mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen (mM) und unterschiedlichen Phosphatasekonzentrationen (units) inkubiert. Das Autoradiogramm zeigt die löslichen Fraktionen nach dem Transport.

Bei einer Phosphatase-Konzentration von 22 Einheiten tritt eine stärkere Bindung der precursor an der Envelopemembran auf. Neben der Hydrolyse von ATP muß ein zweiter Effekt der alkalinen Phosphatase berücksichtigt werden: eine mögliche Dephosphorylierungsreaktion eines phosphorylierten Intermediates im Translocationsprozeß, die sich hemmend auf den Import auswirkt.

Der Chloroplast kann auf verschiedenen Wegen ATP bereit stellen: Im Licht über Photophosphorylierung, im Dunkeln über Stärkeabbau und Glycolyse. So zeigt sich, daß ATP, das über Photophosphorylierung hergestellt wird, ebenfalls den Proteintransport in Gang hält (Tabelle 6).

Mit spezifischen Elektronentransferinhibitoren war es möglich zu zeigen, daß ATP sowohl vom nicht-zyklischen als auch vom zyklischen Elektronentransport geliefert werden kann (DCMU für den nicht-zyklischen, Antimycin A für den zyklischen Elektronentransport) (Bild 19).

Die Verwendung von Entkopplern ist eine übliche Methode, um die Rolle von Protonen- und Kationengradienten in energie-konservierenden Systemen zu untersuchen. Um ein Membranpotential als treibende Kraft für den Import von pSSu auszuschießen, wurden mehrere Arten von Entkopplern untersucht. Ein Kaliumgradient

Tabelle 6: Translocation von pSSu in Chloroplasten im Dunkeln und im Licht.

Behandlung	(μM)	Transport (Moleküle/ μg Protein * h)
dunkel + ATP		$2.4 \cdot 10^4$
dunkel + ATP + Antimycin A	8	$2.0 \cdot 10^4$
hell		$1.0 \cdot 10^4$
hell + Antimycin A	2	$1.2 \cdot 10^4$
hell + Antimycin A	8	$1.1 \cdot 10^4$
hell + ATP + Antimycin A	8	$2.4 \cdot 10^4$

In Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von Antimycin A (μM). ATP-Konzentration 6.6 mM.

ATP	-	-	-	-	6.6	-	6.6
DCMU	1.2	4	8	12	12	12	12
ANTIMYCIN A	-	-	-	-	-	8	8



Bild 19. Wirkung von Elektronentransferinhibitoren auf die Translocation von pSSu. Antimycin A inhibiert den zyklischen, DCMU den nicht-zyklischen Energietransfer. Konzentrationen in μM , ATP-Konzentration in mM.

(0 bis 100 mM) hatte keinen Einfluß auf den Transport, auch nicht in Gegenwart von ATP (Bild 20).

Valinomycin, ein Kalium-spezifischer Ionophor, zeigte in Gegenwart von unterschiedlichen ATP-Konzentrationen (0.6 bis 6.6 mM) ebenfalls keinen Effekt (Bild 20). Nigericin, ein Ionophor mit einer terminalen Carboxylgruppe, wirkt als Kationen-/Protonenaustauscher. Es ist in der Lage, Photophosphorylierung zu entkoppeln. Nigericin (CLINE, 1985) war in Gegenwart von ATP (Tabelle 7) ebenfalls nicht in der Lage, den Proteintransport zu hemmen. Die ermittelten Werte sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von CLINE et al., 1985.

Eine besondere Stellung unter den Entkopplern nimmt als einziger Vertreter der divalenten Polyether-Gruppe der Ionophor A 23187 ein, der selektiv auf zweiwertige

ATP	6.6	-	6.6	-	6.6	-	-	-
KCl	-	-	-	-	70	70	100	100
VALINOMYCIN	-	-	1	1	1	1	-	1

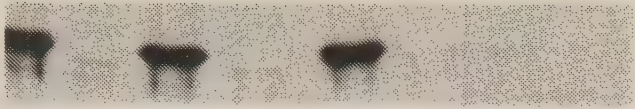


Bild 20. Wirkung des K-Ionophors Valinomycin auf den Proteinimport. Chloroplasten (entsprechend 150 μg Chlorophyll) wurden mit steigenden Konzentrationen an Kalium (mM), mit oder ohne ATP (mM) und Valinomycin (μM) inkubiert und die lösliche Fraktion über SDS-PAGE aufgetrennt.

Tabelle 7: Wirkung von Nigericin auf die Translocation von pSSu in Chloroplasten.

Behandlung	(μM)	Transport (Moleküle/ μg Protein * h)
dunkel + ATP		$7.0 \cdot 10^4$
dunkel + ATP + Nigericin	0.4	$6.8 \cdot 10^4$
hell		$1.7 \cdot 10^4$
hell - ATP + Nigericin	0.4	$8.8 \cdot 10^3$
hell + ATP + Nigericin	0.4	$6.4 \cdot 10^4$

Nigericin-Konzentration in μM , ATP-Konzentration 6.6 mM.

Ionen wirkt und ein gegebenes Gleichgewicht von einwertigen Ionen nicht verändert. Der Ionophor wurde in Konzentrationen von 1 bis 10 μM mit 10 mM Mg^{2+} eingestellt und zeigte in Gegenwart von ATP keine inhibierende Wirkung. Ein sehr wirkungsvoller Entkoppler, sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien, ist CCCP. In Übereinstimmung mit dem Entkopplungsmechanismus bewirkt CCCP, daß die Membranen für Protonen durchlässig werden. Der Protonophor CCCP inhibiert den Proteintransport im Licht durch Entkopplung des photosynthetischen Elektronentransportes, hat aber keinen Einfluß mehr in Gegenwart von ATP (Tabelle 8).

Andere Substanzen, die einen Einfluß auf die gegebenen ATP-Konzentrationen haben könnten, wurden ebenfalls getestet. So hemmt Natriumpyrophosphat bei Etio-plasten und Chloroplasten den Proteintransport. Gibt man zu diesem Ansatz gleich-

Tabelle 8: Wirkung von CCCP auf die Translocation von pSSu in Chloroplasten.

Behandlung	(μ M)	Transport (Moleküle/ μ g Protein * h)
dunkel + ATP		$2.4 \cdot 10^4$
dunkel + ATP + CCCP	30	$2.8 \cdot 10^4$
hell		$1.0 \cdot 10^4$
hell + CCCP	2	$7.4 \cdot 10^3$
hell + CCCP	6	$5.2 \cdot 10^3$
hell + CCCP	10	$3.4 \cdot 10^3$
hell + CCCP	30	$3.4 \cdot 10^3$
hell + ATP + CCCP	30	$1.8 \cdot 10^4$

CCCP-Konzentrationen in μ M, ATP-Konzentration 6.6 mM.

zeitig Pyrophosphatase, wird der hemmende Effekt vollständig aufgehoben; man findet transportierte SSu (Bild 21).

ATP	1	1	1	1	1
PP _i	-	0.5	1	2	1

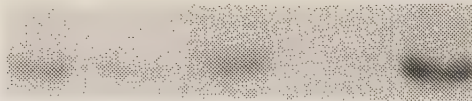


Bild 21. Proteintransport in Gegenwart von Natriumpyrophosphat. Chloroplasten (entsprechend 150 μ g Chlorophyll) wurden mit ATP (mM) und unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumpyrophosphat (mM) inkubiert. Die rechte Spalte enthält zusätzlich Pyrophosphatase (1.5 Einheiten).

Bei geringen ATP-Konzentrationen ist auch ADP in der Lage, den Import zu hemmen (Bild 22).

NaF zeigt bei Etioplasten und Chloroplasten den identischen Effekt (Bild 23).

Bei steigenden Konzentrationen von NaF kommt der Import völlig zum Erliegen und die Anbindung der precursor nimmt zu. Der Effekt ist reversibel. Läßt man unter NaF-Einfluß Vorstufenproteine am Envelope akkumulieren, zentrifugiert die Chloroplasten nach 5 min schonend bei 1000 g und resuspendiert die Chloroplasten im Transportmedium ohne NaF, so findet man Import der gebundenen Vorstufen (Bild 24).

ATP	0.3	0.6	2	6.6	0.6	0.6
ADP	2	2	2	2	0.6	-



Bild 22. Proteintransport in Gegenwart von ADP . Chloroplasten (entsprechend 150 μ g Chlorophyll) wurden mit ATP (mM) und unterschiedlichen Konzentrationen an ADP (mM) inkubiert. Das Autoradiogramm zeigt die prozessierte Form SSu.

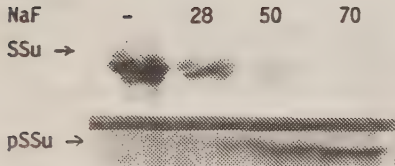


Bild 23. Proteintransport in Gegenwart von NaF . Chloroplasten (entsprechend 150 μ g Chlorophyll) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an NaF (0, 28, 50, 70 mM) inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz in eine lösliche Fraktion (obere Spalte) und eine Membranfraktion (untere Spalte) geteilt und über Autoradiographie weiter aufgetrennt. Die Plastiden wurden nicht, wie sonst üblich, mit Thermolysin verdaut.

Zu einer totalen Hemmung des Imports kommt es unter dem Einfluß von N-ethylmaleinimid (NEM). NEM geht mit Vorstufenproteinen eine kovalente Bindung ein.

Soweit gestatten die Versuche noch keine Rückschlüsse auf den eigentlichen Mechanismus des Transports des Proteins durch die Membran. Behandlung der Hüllmembran mit Protease oder Detergentien setzen die Bindungskapazität der Vorstufenproteine herab (PFISTERER et al., 1982 und BITSCH et KLOPPSTECH, 1986), zeigen aber deutlich die Beteiligung von Rezeptoren an diesem Vorgang. Die eigentliche Funktion der Rezeptoren ist unklar. Bei Mitochondrien wurde mittlerweile festgestellt, daß die Vorstufenproteine bevorzugt an sogenannten "Kontaktstellen" binden. Hierbei handelt es sich um Stellen, an denen die innere und die äußere Membran eng zusammengelagert sind (SCHLEYER et NEUPERT, 1985). Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind für die Hüllmembran ebenfalls solche Kontaktstellen zu erkennen.

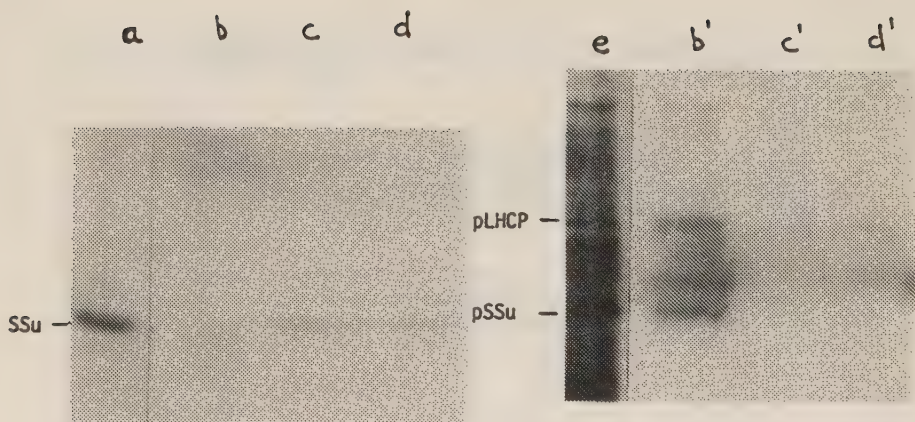


Bild 24. Die hemmende Wirkung von NaF auf den Import ist reversibel. Chloroplasten (entsprechend 150 µg/l Chlorophyll) wurden in Gegenwart von 70 mM NaF 15 min bei 25°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 1000 g pelletiert. Ein Chloroplastenpellet wurde im Überstand resuspendiert und für weitere 30 min bei 25°C inkubiert (lösliche Fraktion Spur b, Membranfraktion Spur b'). Ein Chloroplastenpellet wurde einmal mit Waschmedium gewaschen und für die zweite Inkubation im Transportmedium ohne NaF aufgenommen (Spur c, resp. c'). Ein weiteres Pellet wurde zweimal mit Waschmedium gewaschen, erst dann in Transportmedium aufgenommen und ebenfalls für weitere 30 min inkubiert (Spur d, resp. d'). Spur a: Chloroplastentransport ohne Vorinkubation, Spur e: Translationsprodukte aus postribosomalem Überstand.

Die Temperatur hat einen Einfluß auf die Beschaffenheit der Membranen (u. a. auf die Fluidität und eventuell auch auf die Möglichkeit, solche Kontaktstellen auszubilden), könnte somit auch einen Einfluß auf den Transportvorgang haben. Sowohl Erbsen- als auch Spinatchloroplasten transportieren und prozessieren pSSu in eine protease-resistente reife Form bei einer Temperaturspanne von 2° bis 25°C ohne Unterschied. Der Import scheint daher temperaturunabhängig zu sein. Sogar bei -4°C ist noch prozessierte SSu nachweisbar, aber es kann nicht mehr geprüft werden, ob das reife Protein protease-resistent ist, da die Chloroplasten bei der weiteren Aufreinigung nach dem Versuch bei -4°C schon sehr labil werden. SCHLEYER et NEUPERT, 1985 finden, daß für den Transport des Gesamtproteins höhere Temperaturen notwendig sind. Der nachfolgende Versuch ergab den Hinweis, daß der Durchtritt bei 0° C verlangsamt sein könnte.

Wird der Transportansatz nach Inkubation bei 4° C in Gegenwart von ATP pelletiert, resuspendiert und nochmals bei 25°C inkubiert, so findet man eine geringe Zunahme an proteaseresistenter Form, sofern ein zweites Mal exogenes ATP zum Ansatz gegeben wurde (Bild 25, Spur 3).

Inkubation bei 4° C	1. Inkubation bei 4° C, in Gegenwart von ATP	6.6	6.6	6.6	6.6
	2. Inkubation bei 25° C, mit und ohne ATP			6.6	-
	Thermolysinver- dau bei 4° C		+		
	Thermolysinver- dau bei 25° C			+	+



Bild 25. Temperaturabhängigkeit des Proteintransportes . Chloroplasten (entsprechend 150 μ g Chlorophyll) wurden für 30 min bei 4 °C in Gegenwart von 6.6 mM ATP inkubiert und, wie angegeben, weiterbehandelt. Für eine zweite Inkubation bei 25° C wurden die Chloroplasten durch ein 40%iges Percoll-Kissen zentrifugiert, in Transportmedium resuspendiert und für weitere 30 min bei 25° C inkubiert. Die mit "+" gekennzeichneten Ansätze wurden thermolysin-verdaut. Das Autoradiogramm zeigt die löslichen Fraktionen.

3.3 Proteintransport in Proplastiden

In meristematischen Geweben sind keine Chloroplasten zu finden, sondern deren Vorstufen, die Proplastiden. Es sind kleine (1 bis 1.5 μ m), farblose, undifferenzierte Plastiden (KIRK et TILNEY-BASSET, 1978; WHALEY et al., 1960)(Bild 26).

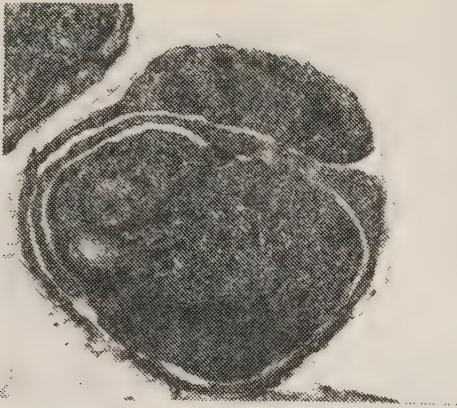


Bild 26. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Proplastiden . Größe entspricht $1\ \mu\text{m}$

Für die Versuche wurde das Hypocotyl aus etiolierten Erbsen verwendet. Die Proplastiden sind nicht in der Lage, das Vorstufenprotein der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase zu transportieren. Eine Anbindung von pSSu ist sowohl in Gegenwart von ATP als auch von NaF zu beobachten (Bild 27). Die gebundene Vorstufe an der Hüllmembran ist thermolysinsensitiv (ohne Abbildung).

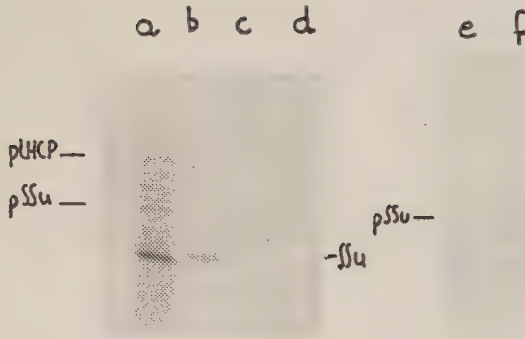


Bild 27. Autoradiogramm von Transport von pSSu. Spur a: postribosomaler Überstand mit pSSu. Im Transportversuch wurden Chloroplasten (Spur b) und Proplastiden (Spur c) in Gegenwart von ATP inkubiert. Spur d: Transportversuch mit Proplastiden in Gegenwart von NaF. Spuren e und f sind die entsprechenden Membranfraktionen zu den Spuren c und d mit gebundenem precursor.

Das Vorhandensein von Kopplungsfaktor als Membranprotein und von LSu als lösliches Protein wurde über Westernblotanalyse getestet. Der Kopplungsfaktor ist in Proplastiden vorhanden (Bild 28). In Etioplasten ist der Kopplungsfaktor ebenfalls nachgewiesen (SCHULZE, Diplomarbeit).



Bild 28. Westernblot mit Antikörper gegen Kopplungsfaktor . Spur 1: lösliche Stromafraktion aus Proplastiden, Spuren 2 und 3: Membranfraktion aus Proplastiden, Spuren 4 und 5: Thylakoidmembran von Chloroplasten. Bei der Trennung der einzelnen Proteinfractionen durch SDS-PAGE wurden nicht definierte Proteinmengen eingesetzt.



Bild 29. Westernblot mit Antikörper gegen LSu . Spur 1: lösliche Stromafraktion von Chloroplasten, Spur 2: lösliche Stromafraktion aus Proplastiden, Spur 3: Membranfraktion von Proplastiden.

Die große Untereinheit der Carboxylase ist in Proplastiden aus Erbse nicht vorhanden (Bild 29). Im Gegensatz dazu kommt LSu in Etioplasten vor. Weitere Charakterisierungsversuche und Transportstudien sind geplant.

3.4 Konstruktion des pSSu - ompA - Klons

Ein Hybridprotein, bestehend aus der Signalsequenz für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase und dem reifen Protein ompA aus *E. coli*, sollte hergestellt werden. Die Signalsequenz sollte gewährleisten, daß das Hybridprotein von der Envelopemembran erkannt und der eigentliche Translocationsprozess eingeleitet wird. Durch die Sequenz des ompA-Proteins, die bei *E. coli* eine Inserierung in die äußere Membran bewirkt, ist eine Blockierung während der Translocation durchaus zu erwarten und somit eine Möglichkeit gegeben, Informationen über beteiligte Rezeptoren und Kontaktstellen zu erhalten.

Die Ausgangsklone pPSR 6/ES 2 und pRD 87 standen zur Verfügung. Die Konstruktion wurde folgendermaßen durchgeführt (Bild 30):

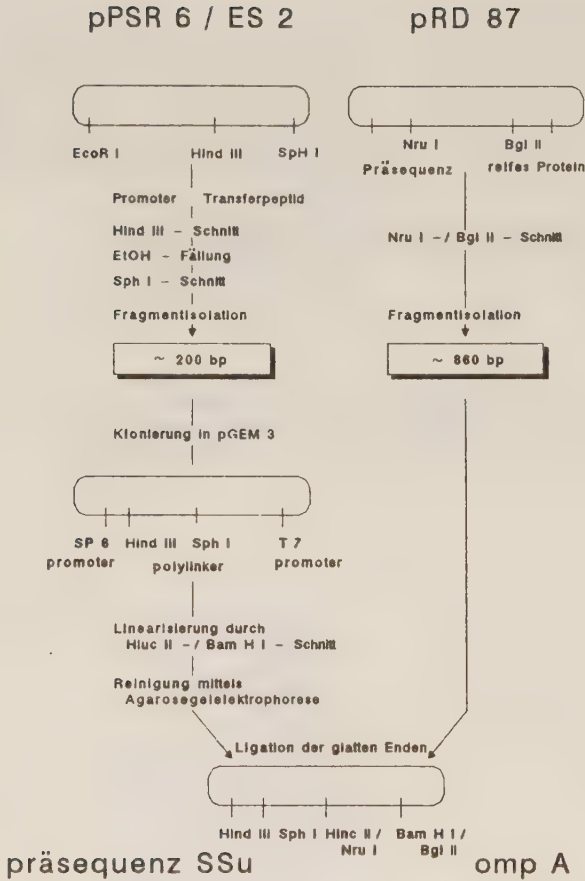


Bild 30. Schematische Darstellung des Konstruktionsweges des pSSu-ompA-Klons

Das EcoRI/SpHI - Fragment des Klon psR6ES2 besitzt einen HindIII - Schnitt, der es in ein etwa 770 bp großes Fragment (promoter) und ein etwa 200 bp großes Fragment (Präsequenz) teilt.

Zuerst wurde das HindIII/SpHI - Fragment aus diesem Klon isoliert und in pGEM 3 kloniert. Die Insertion des 200 bp - Fragments in den Vektor pGEM 3 wurde über Restriktionsendonucleasen-Verdau nachgeprüft. Es befindet sich im pSSu - Fragment eine EcoRV - Schnittstelle (Bild 31).

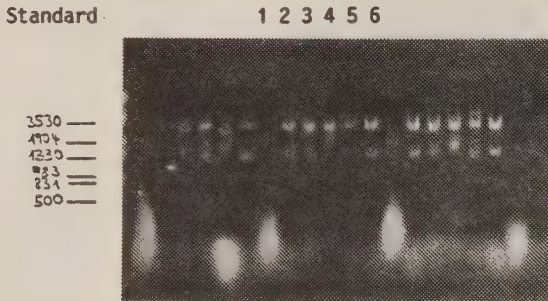


Bild 31. Nachweis des pSSu-Klons . Spur 1: Kontrolle (pSSu-Klon, zirkulär), Spur 2: Hind III-Verdau, Spur 3: Hind III-/SpH I-Doppelverdau, Spur 4: Hind III-/EcoR I-Doppelverdau, Spur 5: SpH I-Verdau, Spur 6: EcoR V-Verdau, Photographie eines 1%igen Agarosegels.

Dieser pSSu - Klon war der Ausgangspunkt für eine zweite Klonierung. Mit einem HincII/BamHI - Schnitt wurde der Klon linearisiert, über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt, dephosphoryliert und war so bereit für die zweite Ligation.

Das Plasmid pRD87 enthält das Gesamtgen für das ompA-Protein. An der Position -15 befindet sich eine NruI - Schnittstelle. Es wurde ein 864 bp großes Fragment mit einem NruI/BglII - Schnitt aus dem Plasmid isoliert. Die Ligation mit dem linearisierten pSSu - Vektor erfolgte über glatte Enden. Eine Überprüfung des inserierten DNA - Fragments erfolgte wieder über Restriktionsendonucleasen-Verdau (Bild 32). Die Ergebnisse aus dem Restriktionsendonucleasenverdau entsprachen den aus der Sequenz ermittelten Daten. Das Hybridgen unterlag in pGEM 3 der Kontrolle des für die SP 6-Polymerase spezifischen Promoters. Nach Linearisierung des Plasmids (EcoR I) wurde das Hybridgen im SP 6-System transkribiert. Als Kontrollversuch wurde radioaktiv markierte RNA synthetisiert. Der Einbau von α -32P-UTP lag bei 93%.

Für die in vitro-Translation wurde das aminoternale Ende der in vitro synthetisierten RNA gekappt (cap Struktur: GpppG) und anschließend im Weizenkeimsystem translatiert. Es zeigte sich jedoch, daß nicht das vollständige Protein translatiert wurde, sondern nur ein Bruchstück.

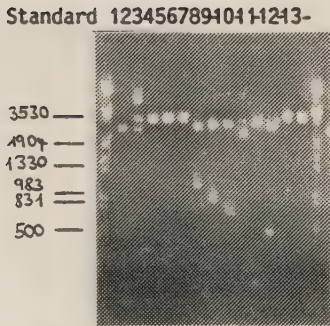


Bild 32. Nachweis des pSSu-ompA-Klons. Spur 1: Kontrolle (pSSu-ompA-Klon, zirkulär), Spur 2: Nru I-Verdau, Spur 3: EcoR V-Verdau, Spur 4: Hind III-Verdau, Spur 5: EcoR I-Verdau, Spur 6: Hind III-/EcoR I-Doppelverdau, Spur 7: PsT I-/EcoR I-Doppelverdau, Spur 8: PsT I-/BamH I-Doppelverdau, Spur 9: Hinc II-Verdau, Spur 10: Pvu II-Verdau, Spur 11: SpH I-Verdau, Spur 12: PsT I-Verdau, Spur 13: BamH I-Verdau, Photographie eines 1%igen Agarosegels. Ein zweiter Verdau mit Hinc II brachte die Linearisierung des Plasmids, die erwartet wurde.

Die Sequenzierung nach SANGER et al., 1977, mit den SP 6- und T_7 -Primern zeigte, daß die Schnittstellen im Anfangsbereich (Hind III) und am Ende (Bgl II/BamH I) korrekt waren.

Die Hinc II/Nru I-Schnittstelle - etwa 200 bp vom SP 6-Promoter entfernt - lag schon in dem Bereich, in dem eine Deletion oder Insertion einer Base auf dem Gel nicht mehr exakt auszumachen war. Ein weiterer Restriktionsendonukleasenverdau führte zu folgendem Ergebnis: Der pSSu-ompA-Klon wurde mit Sal I und Xba I verdaut. Erwartet wurde, daß der Klon zirkulär bleiben würde, da durch den vorangegangenen Hinc II-Verdau bei der Klonierung des ompA-Fragments die Sal I/Xba I-Schnittstellen eliminiert waren.

Der pSSu-ompA-Klon wurde jedoch von beiden Enzymen linearisiert (ohne Abb.), d.h. der linearisierte pSSu-Vektor enthielt zusätzliche Basen, die somit eine Änderung des Leserasters bewirkten und einen Stopcodon bildeten, was zu einem verkürzten Protein in der in vitro-Translation führte.

Die neue Klonierungsarbeit wird folgendermaßen aufgenommen: Klonierung des ompA-Fragments in pGEM 3 über einen BamH I-/Hinc II-Schnitt. Nach Überprüfung des ompA-pGEM 3-Klons wird ein PsT I-/EcoR I-Fragment isoliert und mit dem PsT I/EcoR I-linearisierten pSSu-Klon ligiert.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Proteintransport der Kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase in Plastiden untersucht; insbesondere interessierte, die Fähigkeit der Plastiden zum Transport in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand zu zeigen und den Energiebedarf für die Translokation des Vorstufenproteins genauer zu definieren.

Mehrere Plastidenformen sind bekannt: Der Proplastid, der in meristematischen Zellen als undifferenziertes Organell vorkommt, kann sich in einen Amyloplasten, Etioplasten, Chloroplasten oder Chromoplasten entwickeln (BUETOW, 1986)(Bild 33).

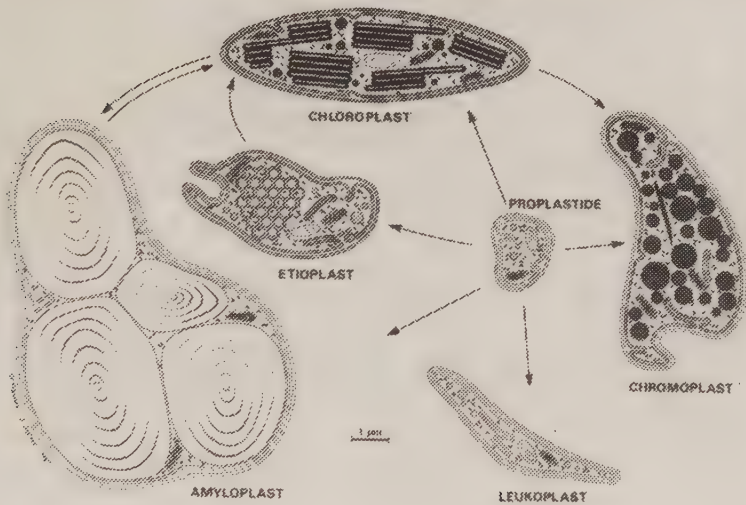


Bild 33. Entwicklungswege des Plastiden . Mögliche Entwicklungswege des Proplastiden abhängig von der Lokalisation innerhalb der Pflanze und den Lichtverhältnissen.

Allgemein wird akzeptiert, daß die verschiedenen Plastidenformen in einer Pflanze das gleiche Genom besitzen und nur unterschiedliche Stadien in der Entwicklung dieses Organells darstellen (BUETOW, 1986). Die Chloroplastenentwicklung wird durch zwei Genome, einerseits das Kern-, andererseits das eigene, Plastidengenom, kontrolliert. Die Kontrolle über die Expression der Gene kann auf Transkriptions- oder Translationsebene stattfinden. Über das Zusammenspiel der beiden Genome ist wenig bekannt. Zusätzlich kann auf den verschiedenen Ebenen eine Regulation über Licht eine Rolle spielen.

Die Entwicklung eines Proplastiden zu einem Chloroplasten bei den Angiospermen ist lichtabhängig. Der Prozess bewirkt eine einschneidende Änderung im Metabolismus (Synthese von Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden) und die Ausbildung eines komplexen Systems von photosynthetisch aktiven Membranen.

Die Transportversuche mit Proplastiden zeigen, daß der Plastid in diesem frühen Stadium nicht in der Lage ist, das Vorstufenprotein der kleinen Untereinheit zu transportieren. Eine Anbindung wird beobachtet. Die große Untereinheit der Carboxylase ist in der löslichen Proteinfraction des Proplastiden nicht nachweisbar. Berücksichtigt man, daß eine Regulation zwischen den beiden Genomen vorhanden sein muß, damit die Entwicklung zu einem funktionstüchtigen Chloroplasten gewährleistet ist, kann man vermuten, daß erst mit dem Erscheinen der großen Untereinheit im Plastiden die Möglichkeit zum Transport der kleinen Untereinheit durch die Hüllmembran etabliert wird.

Ein oft benutztes Objekt zur Untersuchung der Chloroplastenentwicklung sind die Etioplasten, Plastidenformen von im Dunkeln angezogenen Pflanzen. Bei Belichtung findet die Entwicklung zum Chloroplasten statt. Wir haben nun eine Methode entwickelt, gereinigte und intakte Etioplasten aus Erbsen zu isolieren und waren so in der Lage, den Proteintransport zu untersuchen (SCHINDLER und SOLL, 1986). Die Ergebnisse zeigen, daß Etioplasten das Vorstufenprotein für die kleine Untereinheit der Carboxylase (pSSu) erkennen, binden, durch die Hüllmembran transportieren und zum reifen Protein (SSu) prozessieren. Dieser Transport verbraucht Energie in Form von ATP. Die Etioplasten sind somit in der Lage, ein Protein zu transportieren, daß zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung im Organell noch nicht vorhanden ist.

Die mRNA liegt in geringen Mengen (0.5% des Gehalts nach 48 Stunden Belichtung) vor, das Protein unter der Nachweisgrenze (BENNET et al., 1984). Mit einsetzender Belichtung steigt der Gehalt sowohl an mRNA als auch an Protein an. Es besteht eine enge Korrelation zwischen mRNA- und Proteinkonzentration, was auf eine Regulation der SSu - Akkumulation über die Konzentration ihrer mRNA hindeutet (diese wiederum wird durch Phytochrom auf Transkriptionsebene reguliert). Um Transport und Bindung der pSSu zu ermöglichen, muß der noch nicht näher charakterisierte Rezeptor in der Hüllmembran bereits vorhanden sein.

Weiterhin haben wir den Zusammenbau der transportierten und prozessierten kleinen Untereinheit mit der bereits in den Etioplasten vorhandenen großen Untereinheit (LSu) untersucht. Nach SMITH und ELLIS, 1979, finden Prozessierung und Zusammenbau zum Holoenzym im Stroma des Chloroplasten statt.

Nach dem Auftrennen der löslichen Stromaproteine der Etioplasten über Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen konnte als Hauptbande ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 500000 angefärbt und über Westernblot-Analyse als LSu identifiziert werden. Wir definierten dieses Protein als Ribulose 1,5-bisphosphatcarboxylase - Oligomer. Die kleine Untereinheit konnte nicht nachgewiesen werden.

GALLAGHER et al., 1984, SASAKI et al., 1984 und FOURCOY et al., 1985 finden in Erbsenetioplasten geringe Mengen an mRNA, die vielleicht zur Translation von durch die Westernblot-Analyse gerade nicht mehr nachweisbaren Mengen an SSu ausreichen. Diese könnten sich dann mit der Großen Untereinheit zum gefundenen Oligomer verbinden.

Das Holoenzym wird in im Dunkeln angezogenen Rettichpflanzen in 5 bis 10% der lichtinduzierten Menge gefunden (THOMPSON et al., 1983). Für die Transportversuche verwendeten wir Erbsen, die 11 Tage im Dunkeln angezogen, in dieser Zeit 2 -

3 mal gewässert und dann in grünem Sicherheitslicht geerntet wurden. Unter diesen Bedingungen sollten Phytochromeffekte auszuschließen sein. In den Etioplasten konnte nur Protochlorophyllid nachgewiesen werden, also reichte das Licht während Anzucht und Ernte nicht zu der (sehr sensitiven) Reduktion von Protochlorophyllid zu Chlorophyllid aus. Nach den Transportversuchen findet man unter nicht denaturierendem PAGE die transportierte und prozessierte SSu-Form zu etwa 30% mit der Großen Untereinheit assoziiert. Um dieses Ergebnis nochmals zu überprüfen, wurden Erbsen in absoluter Dunkelheit gequollen, angesät und gegossen. Erst die Ernte erfolgte in Grünlicht. Das Proteinmuster und das Westernblotergebnis unterschieden sich in keinsten Weise von bisherigen Aufarbeitungen.

Über den Proteintransport in Chloroplasten war zu Beginn der Arbeit noch wenig bekannt. GROSSMANN et al., 1980, konnten zeigen, daß der Transport durch Licht und durch exogenes ATP im Dunkeln stimuliert wird.

Die Translokation, d.h. der eigentliche Durchtritt der Vorstufenproteine durch die Membran, ist der eigentliche energieabhängige Schritt. Die Tatsache, daß in der äußeren Hüllmembran eine Kinase lokalisiert ist, führte in unserer Gruppe zur Aufstellung der Hypothese, daß am Transfer von Vorstufenproteinen durch die Hüllmembran ein Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungszyklus beteiligt ist. Die Ergebnisse an Chloroplasten und Etioplasten zeigen, daß zur Stimulation des Transports die Hydrolyse von ATP notwendig ist. In Gegenwart von nicht hydrolysierbaren ATP-Analogen wie AMP-PNP und AMP-PCP kommt der Transport vollständig zum Erliegen. Er kommt durch Zugabe von ATP wieder in Gang. Die energiereichen Nukleosidtriphosphate CTP, UTP und GTP können ATP ebenfalls nicht ersetzen. ATP-senkende Systeme außerhalb des Chloroplasten wie etwa alkaline Phosphatase oder Glucose/Hexokinase inhibieren den Transport ebenfalls vollkommen. Glucose-6-phosphat zeigt dagegen keine inhibierende Wirkung. Auf der anderen Seite können ATP-erzeugende Enzymsysteme als Energielieferanten für die Translocation herangezogen werden.

ATP, das im Inneren des Chloroplasten durch das OAA/DHAP-System im Dunkeln gebildet wird (die ATP-Konzentration erreicht dabei nach ROBINSON, 1984, die im Licht gebildeten Werte), fördert den Import in gleichem Maße wie ATP, das außerhalb des Chloroplasten durch das Phosphoenolpyruvat-/ADP-System entsteht. Elektronentransferinhibitoren wie DCMU oder Antimycin A zeigen, daß ATP entweder vom nichtzyklischen oder vom zyklischen Elektronentransport zur Verfügung gestellt werden kann.

Chloroplasten besitzen ein vielseitiges System, um ATP für den Import von Proteinen zur Verfügung zu stellen. Gerade während der Entwicklung des Organells ist von entscheidender Bedeutung, nicht nur an eine ATP-Quelle gebunden zu sein. Etioplasten sind nicht in der Lage, über Photophosphorylierung ATP zu bilden. Sie können ATP aus der Hydrolyse von Stärke verwenden oder müssen sich mit cytosolischem ATP versorgen.

Während die äußere Hüllmembran für ATP durchlässig ist, bildet die innere Membran eine Barriere. Der Austausch der Nukleosidtriphosphate erfolgt über ein spezifisches carrier-System, wodurch der Transport von ATP an den Ort des jeweiligen Verbrauchs gewährleistet wird. Weitere Versuche zeigen einen ATP-Bedarf an der äußeren Seite der äußeren Envelope-Membran oder zumindest an der äußeren Seite der inneren Envelope-Membran: Hexokinase, ein Protein, das die äußere Hüllmembran nicht durchdringt, hemmt den Proteintransport vollständig, wenn im Inneren des Chloroplasten im Dunkeln durch Substratphosphorylierung ATP erzeugt wird.

Zusammenfassend kann man sagen, daß der Proteintransport in Etioplasten auch in Gegenwart von Licht exogenes ATP benötigt, d.h. er müßte in vivo sein ATP aus dem Cytosol oder durch Stärkehydrolyse aus dem Etioplastenstroma beziehen. STITT et al., 1982, konnten zeigen, daß die Konzentration von ATP im extrachloroplastischen Raum in Licht und Dunkel nicht sehr stark variiert. Der Proteintransport in Chloroplasten wird durch Licht stimuliert, d.h. er verwendet durch Photophosphorylierung gebildetes ATP. Dies konnte durch Inkubation der Chloroplasten mit OAA/DHAP im Dunkeln simuliert werden. Durch Zugabe von ATP im Dunkeln wird pSSu ebenfalls in den Chloroplasten transportiert. Im Licht stehen dem Chloroplasten zwei ATP-pools zur Verfügung - das Cytoplasma und das Stroma.

Im Vergleich dazu findet man bei den verschiedenen Systemen, bei denen Vorstufenproteine durch die Membranen transportiert und/oder integriert werden, unterschiedliche Ergebnisse. Für den Export von Proteinen aus *E. coli* ist offenbar das Membranpotential die eigentliche Energiequelle.

Bis zu 20% der Gesamtproteine von Gram-negativen Bakterien existieren außerhalb des Cytoplasmas, sind also in der inneren und äußeren Membran lokalisiert. Viele dieser Proteine werden als precursor synthetisiert und während des Exports prozessiert (NOVAK et al., 1986). Das "M 13 coat"-Protein ist ein integrales *E. coli*-Plasmamembranprotein von M 13-infizierten Zellen und mit seiner N-terminalen Seite zum periplasmatischen Raum hin ausgerichtet (KUHN et al., 1986). Der lösliche, cytoplasmatische precursor, "procoat" genannt, bindet an die Plasmamembran und wird nur in Gegenwart eines elektrochemischen Gradienten prozessiert und in die Membran integriert (DATE et al., 1980).

ENEQUIST et al., 1981, finden ebenfalls, daß für den Export von vielen periplasmatischen und äußeren Membranproteinen eine energiereiche Membran entscheidend ist, so etwa für die Proteine ompF, ompA und lamB (alle in der äußeren Membran). Durch Studien an uncA - Mutanten konnte gezeigt werden, daß das gesamte Protonenmotorische Potential (Δp) die benötigte Energieform darstellt. Der Export von beta-Lactamase aus *E. coli* K 12 bedarf ebenfalls der gesamten Protonenmotorischen Kraft (BAKKER und RANDALL, 1984).

In den letzten zwei Jahren sind immer mehr Arbeiten zu finden, die ATP als Energiequelle nachweisen können. So finden CHEN und TAI, 1985, daß für die Translocation von alkaliner Phosphatase und ompA-Protein in *E. coli*-Vesikel ATP essentiell ist. YAMANE et al., 1987, finden eine Beteiligung zweier Komponenten (d.h. Protonenmotorische Kraft und ATP).

Für die Sekretion von Proteinen in Hefe konnte an mikrosomalen Membranen gezeigt werden, daß für die Translocation des prepro- α -factors Energie in Form von ATP benötigt wird (WATERS und BLOBEL, 1986).

Beim Proteintransport in Mitochondrien kann man folgendermaßen unterscheiden: Das mitochondriale Porin, ein Hauptprotein der äußeren Membran, wird ohne Präsequenz hergestellt. Zur Insertion in die Membran wird keine Energie verbraucht (FREITAG et al., 1982). Für eine Vielzahl von Vorstufenproteinen, deren Bestimmungsort in der inneren Membran oder in der Matrix liegt und die daher zwei Membranen passieren müssen (z.B. ADP/ATP-carrier, die Untereinheit 9 der ATPase, Cytochrome b_2 , c_1 und die Untereinheiten I, II, V und VII des Cytochrom b_c_1 -Komplex), ist die Translocation der Proteine energieabhängig. Benötigt wird das Elektrische Membranpotential (REID, 1985).

Neueste Arbeiten (PFANNER et NEUPERT, 1986) postulieren, daß sowohl ein Membranpotential als auch Nukleosidtriphosphate benötigt werden. REID und SCHATZ, 1982, beobachten, daß Hefe-Sphäroplasten, die in CCCP-Medium wachsen, große Mengen von precursor akkumulieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Import und Prozessierung von Cytochrom b_2 und c_1 nur in Gegenwart einer energetisierten inneren Membran stattfindet (REID et al., 1982 und GASSER et al., 1982). Paradox erscheint, daß ρ -Mutanten von Hefe, bei denen die Funktion von ATPase und Atmungskette ausgeschaltet ist, Vorstufenproteine importieren können. Mitochondrien des Wildtyps hingegen importieren in Gegenwart von KCN und Oligomycin nicht (NELSON und SCHATZ, 1979).

Die Translocation von Vorstufen etwa der Großen Untereinheit der Succinatdehydrogenase (SDH) und Ornithinaminotransferase (OAT) in Mitochondrien von Rattenleber wird in Gegenwart von ATP stimuliert (ONO et TUBOI, 1986).

Die mögliche Beteiligung eines Membranpotentials wurde durch den Einsatz von Ionophoren untersucht. Das gesamte elektrochemische Potential (gesamte Protonenmotorische Kraft Δp) läßt sich in zwei Komponenten zerlegen: Das Membranpotential und den Protonenkonzentrationsgradienten ΔpH . Im Chloroplasten besteht Δp (200 - 300 mV, Thylakoidinnenseite pos.) hauptsächlich aus ΔpH (REED, 1979). Eine Zerstörung des Membranpotentials bedeutet daher auch eine Verminderung des internen ATP-Spiegels, da die ATPase an der Thylakoidmembran durch Hydrolyse von ATP versucht, das Membranpotential zu erhalten. Wenn ein Membranpotential für die Translocation notwendig ist, sollten Ionophoren auch in Gegenwart von ATP einen drastischen Effekt zeigen.

Durch Zugabe von Valinomycin bei verschiedenen Kalium-Konzentrationen (Aufbau eines K-diffusionspotentials, Innenseite positiv) im Dunkeln konnte der Import von pSSu nicht stimuliert werden. Im Licht neutralisiert Valinomycin/K⁺ das elektrische Feld über der Thylakoid-Membran durch den Gegentransport von Kalium (HAUSKA und TREBST, 1977). Der Ionophor A 32187, der in Gegenwart von zweiwertigen Ionen wie Mg²⁺ die Photophosphorylierung entkoppelt, zeigt in Gegenwart von ATP keinen Einfluß. Der für Protonen spezifische Entkoppler CCCP hemmt den lichtgetriebenen Import von pSSu. Dieser Effekt kann durch Zugabe von ATP aufgehoben werden. CCCP zerstört den Protonenfluß über der Thylakoid- und der Hüllmembran, eine Zunahme des Protonengradienten zwischen Stroma und Thylakoidinnenraum ist daher nicht mehr möglich (HELDT et al., 1973). Der Transport im Dunkeln in Gegenwart von ATP war vollkommen unbeeinflusst. HELDT, 1969, beschreibt in einer seiner früheren Arbeiten eine weitere Wirkung des Protonophors: Bei Chloroplasten von Spinat blockiert CCCP die Translocation von ATP/ADP/AMP über den Adeninnucleotidtranslocator. Mehrere Effekte der Ionophoren sind also nicht auszuschließen. Die Versuche zeigen aber deutlich, daß keine Komponente der Protonenmotorischen Kraft an der Translocation beteiligt ist.

Durch spezifische Inhibitoren konnte eine Beteiligung der an der inneren Hüllmembran lokalisierten ATPase ausgeschlossen werden. Weitere Effekte, die entweder eine Hydrolyse von ATP oder eine Variation des internen ATP-Spiegels bedingen, haben eine hemmende Wirkung auf den Import von Vorstufenproteinen in den Chloroplasten. In Gegenwart von ADP und P_i sinkt die Transportrate drastisch. ROBINSON und WISKICH, 1977, finden eine Inhibierung der CO₂-abhängigen Bildung von O₂ in jungen Erbsenchloroplasten in Gegenwart von P_i, die durch ATP aufgehoben werden kann. Sie vermuten, daß P_i im Austausch gegen endogene Adeninnucleotide

via Adeninnucleotid-Transporter in den Chloroplasten gelangt und so den internen ATP-Spiegel senkt.

Welches ist nun aber der eigentliche energieverbrauchende Schritt im Translocationsprozeß?

Die hemmende Wirkung von NaF - als Phosphataseinhibitor bekannt - auf den Proteintransport sowohl in Chloroplasten als auch in Etioplasten, bestätigt die ursprüngliche Idee, daß ein Phosphorylierungs-/ Dephosphorylierungsschritt während des Imports entscheidend ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch das Vorhandensein einer Kinase an der äußeren Envelope-Membran. Sie phosphoryliert eine Reihe von äußeren und inneren Membranproteinen und zeigt entsprechende Antworten auf Inhibitoren, die im Proteintransport untersucht wurden. Es besteht die Möglichkeit, daß die Kinase, der Rezeptor oder die Vorstufenproteine phosphoryliert werden, wobei nicht auszuschließen ist, daß die Kinase selbst der Rezeptor ist (Kinasereaktionen nach SOLL, 1985). Versuche zur Phosphorylierung von Transportansätzen (nicht markierte Translationsansätze plus intakte Chloroplasten oder envelope-Membranen) mit ATP führten zu keinem eindeutigen Ergebnis. Die hemmende Wirkung der alkalinen Phosphatase kann einmal durch die Hydrolyse von externem ATP, aber auch durch die Hydrolyse eines energiereichen Intermediates erklärt werden. FLÜGGE et HINZ, 1986, konnten zeigen, daß in Gegenwart von alkaliner Phosphatase das stromale ATP-Niveau unbeeinflusst bleibt.

Mehr Aufschluß über den mechanistischen Aspekt des Transportvorganges sollte die Konstruktion des Hybridproteins pSSu-ompA bringen. Die Synthese des Proteins war nicht möglich (zusätzliche Basen bewirkten eine Verschiebung im Leseraster und führten zu einem Stopcodon), und somit entfielen leider auch die entsprechenden Transportversuche. Ein erneutes Klonieren und Identifizieren der erhaltenen Klone war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, wird aber in einem anderen Rahmen noch in Angriff genommen.

Aus mehreren Gründen erschien es interessant, ein solches Konstrukt herzustellen. Zum Einen war bekannt, daß das ompA-Protein ein Protein der äußeren Membran von *E. coli* ist. Es wird als Vorstufenprotein im Cytoplasma synthetisiert und während des Exportvorgangs in die äußere Membran inseriert.

Wie für jedes Vorstufenprotein gilt, daß das Protein Informationen enthalten muß, um den jeweils vorgegebenen Bestimmungsort zu erkennen. Dabei wird die Funktion der Signalsequenz beim Proteintransport in Mitochondrien und bei *E. coli* unterschiedlich beurteilt (SILHAVY et al., 1983). Bei Mitochondrien gibt es mehrere Hinweise, daß die Signalsequenz ausreicht, um das Protein in die Mitochondrien zu transportieren. Ein Konstrukt, bestehend aus der Präsequenz des OTC-Proteins und Dihydrofolatreduktase (DHFR), einem cytosolischen Protein aus Mauszellen, wird in Mitochondrien transportiert (HORWICH et al., 1985). Deletionen innerhalb der Signalsequenz (Aminosäuren an Position 8 bis 22) bewirken, daß kein Import mehr stattfindet (HORWICH et al., 1986).

Die ersten 41 Aminosäuren am N-terminalen Bereich des 70 kD-Proteins gewährleisten, daß das Protein die äußere Mitochondrienmembran erkennt und in die Membran integriert wird. Diese 41 Aminosäuren können in zwei Segmente gegliedert werden: die ersten 11 Aminosäuren sind hydrophil und basischer Natur und vermitteln die erste Bindung an die Membran. Die restlichen Aminosäuren sind ungeladen und fungieren als eine Art Anker, d.h. das Protein wird in die Membran integriert und nicht weiter in den Matrixraum transportiert (HASE et al., 1984).

Es wird postuliert, daß die Signalsequenz zweierlei Informationen enthält: ein Abschnitt, der das Erkennen des Ziels - hier die äußere Mitochondrienmembran - ermöglicht, und einen zweiten Abschnitt, der, je nach Bestimmungsort des Proteins, eine stop-transfer-Information liefert (LOON et al., 1986). Für äußere Membranproteine von *E. coli* wird hingegen beschrieben, daß die Signalsequenz für Transport und Insertion des Proteins nicht ausreicht. Die Information über Transport und Insertion liegt in der Konformation des entsprechenden Proteins, d.h. auch andere Abschnitte innerhalb der Sequenz des reifen Proteins spielen eine Rolle. Die Bedeutung der Signalsequenz als alleinige Informationsquelle entfällt damit (FREUDL et al., 1979).

Zum Anderen war von Mitochondrien bekannt, daß im Translokationsprozeß auftretende Intermediate sowohl Verbindung mit der äußeren als auch der inneren Membran haben und daß demzufolge sogenannte Kontaktstellen in den beiden Membranen existieren müssen (SCHLEYER et NEUPERT, 1985). SCHWAIGER et al.(in Druck) konnten zeigen, daß diese Kontaktstellen sehr stabile Gebilde sind. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Envelope-Membranen sind ebenfalls solche Kontaktstellen ausfindig zu machen (CARDE et al., 1982).

Das Verhalten des pSSu-ompA-Proteins sollte im Transportexperiment mit Chloroplasten untersucht werden. Mit dem Konstrukt waren und sind auch weiterhin Experimente geplant; es ist durchaus zu erwarten, daß dieses Protein die Envelope-Membran erkennt (gewährleistet durch die Signalsequenz der kleinen Untereinheit). Eine weitere Vermutung ist, daß die Translokation durch die Hüllmembran inhibiert ist (bedingt durch den Aufbau des ompA-Proteins). Eine Identifizierung des gebundenen pSSu-ompA-Proteins ist durch das Vorhandensein von Antikörpern gegen das ompA-Protein möglich.

Tritt tatsächlich ein stabiler Komplex aus pSSu-ompA-Protein und Hüllmembran auf, sollte es möglich sein, Informationen über die Lokalisierung innerhalb der Membran und somit über vorhandene Kontaktstellen zu erhalten. Eine weitere Charakterisierung des Intermediats, insbesondere seines energetischen Zustandes, sollte ebenfalls erleichtert sein.

5. Zusammenfassung

Nach den vorliegenden Ergebnissen sind folgende Schritte bei dem Proteintransport der kleinen Untereinheit der Carboxylase in Chloroplasten und Etioplasten aus Erbse beteiligt:

- Das Vorstufenprotein bindet an der Außenseite der Hüllmembran in einem energieunabhängigen Schritt.
- Für den Import wird ATP benötigt; Versuche mit nicht hydrolysierbaren ATP-Analogen zeigen, daß die Hydrolyse von ATP entscheidend ist.
- Durch die Möglichkeit, gereinigte und intakte Erbsenetioplasten und Proplastiden zu gewinnen, wurden zum ersten Mal Proteintransportversuche mit diesen durchgeführt.
- Proplastiden sind nicht in der Lage, die Vorstufe der kleinen Untereinheit zu transportieren.
- Etioplasten müssen sowohl im Dunkeln als auch im Licht mit exogenem ATP versorgt werden.
- Chloroplasten benötigen exogenes ATP im Dunkeln, im Licht wird pSSu ohne Zugabe von ATP transportiert. Die Transportrate kann durch Zugabe von ATP nochmals gesteigert werden.
- Durch geeignete Enzymsysteme kann der ATP-Spiegel variiert werden; ATP-synthetisierende Systeme wie PEP/Pyruvatkinase erhöhen den ATP-Spiegel außerhalb, das OAA/DHAP-System innerhalb des Chloroplasten. Beide Systeme stimulieren den Proteintransport in vergleichbarer Weise.
- ATP senkende Systeme wie Glucose/Hexokinase bringen den Import von Vorstufenproteinen völlig zum Erliegen.
- Eine Kombination beider Systeme (OAA/DHAP und Glucose/Hexokinase) läßt den Schluß zu, daß ATP an der Außenseite der äußeren Membran benötigt wird.
- Versuche mit Entkopplern und Energietransferinhibitoren wie DCMU und CCCP schließen die Beteiligung eines Membranpotentials aus.
- Der Einfluß der an der inneren Membran lokalisierten ATPase wurde mit spezifischen Inhibitoren dieser ATPase wie Na_3VO_4 , LaCl_3 und ShCl_3 getestet. Er kann nahezu ausgeschlossen werden.
- Die hemmende Wirkung von alkaliner Phosphatase und NaF legen nahe, daß während des Imports ein energiereiches Intermediat durch Phosphorylierung gebildet wird. Dephosphorylierung findet vor oder während der Translocation statt.
- Die transportierte, processierte kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase assoziiert mit der im Stroma lokalisierten großen Untereinheit.

6. Literatur

- ARNON, D.J.: Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*
Plant Physiol. 24, 1-15, 1949
- BAKKER, E.P. et RANDALL, L.L.: The requirement for energy during the export of β -lactamase in *E. coli* is fulfilled by the total protonmotive force
The Embo J. 3, 895-900, 1984
- BASSFORD, P.J., SILHAVY, T.J. et BECKWITH, J.R.: Use of gene fusion to study secretion of maltose-binding protein into *E. coli* periplasm
J. Bacteriol. 139, 19-31, 1979
- BENNET, J., JENKINS, G.I. et HARTLEY, M.R.: Differential regulation of the accumulation of the light-harvesting chlorophyll a/b complex and ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in greening pea plants
J. of Cell. Biochemistry 25, 1-13, 1984
- BIRNBOIM, H. et DOLY, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening rekombinant plasmid DNA
Nucl. Acid Res. 7, 1513-1526, 1979
- BITSCH, A. et KLOPPSTECH, K.: Transport of proteins into chloroplasts: Reconstitution of the binding capacity for nuclear coded precursor proteins after solubilization of envelopes with detergents
Eur. Journal of Cell Biology 40, 160-166, 1986
- BLOBEL, G. et DOBBERSTEIN, B.: Transfer of proteins across membranes
J. Cell Biology 67, 835-851, 1975
- BONNER, W.M. et LASKEY, R.A.: A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels
Eur. J. Biochem. 46, 83-88, 1974
- BÜNEMANN, H., WESTHOFF, P. et HERRMANN, R.G.: Immobilization of denatured DNA to macroporous supports: 1. Efficiency of different coupling procedures
Nuc. Acid Res. 10, 7163-7180, 1982
- BUETOW, D.E.: Chloroplast development: Regulation of Chloroplast differentiation
Alan R. Liss Inc., 427-432, 1986
- CARDE, J.P., JOYARD, J. et DOUCE, R.: Electron microscopic studies of envelope membranes from spinach plastides
Biol. Cell. 44, 315-324, 1982

CHEN, L. et TAI, P.C.: ATP is essential for protein translocation in *E. coli* membrane vesicles

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4384-4388, 1985

CHUA, N.H. et SCHMIDT, G.W.: Post-translational transport into intact chloroplasts of a precursor to the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 6110-6114, 1978

CHUA, N.H. et SCHMIDT, G.W.: Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts

J. Cell Biology 81, 461-483, 1979

CLINE, K., WERNER-WASHBURNE, M., LUBBEN, T.H. et KEEGSTRA, K.: Precursors to two nuclear-encoded chloroplast proteins bind to the outer envelope membrane before being imported into chloroplasts

J. Biol. Chem. 260, 3691-3696, 1985

CORUZZI, G., BROGLIE, R. CASHMORE, A. et CHUA, N.H.: Nucleotide sequences of two pea cDNA clones encoding the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and the major chlorophyll a/b binding thylakoid polypeptide

J. Biol. Chem. 258, 1399-1402, 1983

DATE, T., ZWIZINSKY, C., LUDMERER, S. et WICKNER, W.: Mechanism of membrane assembly: Effects of energy poisons on the conversion of soluble M13 coliphage procoat to membrane-bound coat protein

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 827-831, 1980

DATE, T., GOODMAN, J.M. et WICKNER, W.T.: Procoat, the precursor of M13 coat protein, requires an electrochemical potential for membrane insertion

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4669-4673, 1980

DELEPELAIRE, P. et CHUA, N.H.: Lithium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis of thylakoid membranes at 4 °C: Characterizations of two additional chlorophyll a protein complexes

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 111-115, 1979

DIRIENZO, J.M., NAKAMURA, K. et INOUE, M.: The outer membrane: Proteins of gram-negative bacteria: Biosynthesis, assembly and functions

Ann. Rev. Biochem. 47, 481-532, 1978

DOUCE, R. et JOYARD, J.: Structure and function of the plastid envelope

Adv. Bot. Res. 7, 1-116, 1979

ELLIS, R.J.: Protein synthesis by isolated chloroplasts

BBA 463, 182-215, 1977

- ENEQUIST, G., HIRST, T.R., HARAYAMA, S., HARDY, S.J.S et RANDALL, L.L.: Energy is required for maturation of exported proteins in *E. coli*
Eur. J. Biochem. 116, 227-233, 1981
- FLÜGGE, U.I. et HINZ, G.: Energy dependence of protein translocation into chloroplasts
Eur. J. Biochem. 160, 563-570, 1986
- FOURCOY, P., KLEIN-ENDE, D. et LAMBERT, C.: Phytochrome control of gene expression in raddish seedlings II: Far red light mediated appearance of the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and the mRNA for the small subunit
Plant. Sci. Lett. 37, 235-244, 1985
- FREITAG, H., JANES, M. et NEUPERT, W.: Biosynthesis of mitochondrial porin and insertion in the outer mitochondrial membrane of *Neurospora crassa*
Eur. J. Biochem. 126, 197-202, 1982
- FREUDL, R., SCHWARZ, H., KLOSE, M., MOCVA, N.R. et HENNING, U.: The nature of information, required for export and sorting, present within the outer membrane protein ompA of *E. coli* K 12
The Embo J. 4, 3593-3598, 1985
- GALLAGHER, T.F., SMITH, S.M., JENKINS, G.J. et ELLIS, R.J.: Chloroplast Biogenesis
Cambridge University Press (ELLIS, R.J. Ed.), 303-321, Cambridge, 1984
- GASSER, S.M., DAUM, G. et SCHATZ, G.: Import of proteins into mitochondria
J. Biol. Chem. 257, 13034-13041, 1982
- GASSER, S.M., OHASI, A., DAUM, G., BÖHNI, P.C., GIBSON, J., REID, G.A., YONETANI, T. et SCHATZ, G.: Imported mitochondrial proteins cytochrome b and cytochrome c are processed in two steps
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 267-271, 1982
- GROSSMANN, A., BARTLETT, S. et CHUA, N.H.: Energy-dependent uptake of cytoplasmatically synthesized polypeptides by chloroplasts
Nature 285, 625-628, 1980
- HARPSTER, M. et APEL, K.: The light-dependent regulation of gene expression during plastid development in higher plants
Physiol. Plant. 64, 147-152, 1985
- HASE, T., MÜLLER, U., REIZMAN, H. et SCHATZ, G.: A 70 kD protein of the yeast mitochondrial outer membrane is targeted and anchored via its extreme amino terminus
The Embo J. 3, 3157-3164, 1984
- HATCH, M.D., DRÖSCHER, L., FLÜGGE, U.I. et HELDT, H.W.: A specific translocator for oxalacetate transport in chloroplasts
FEBS Lett. 178, 15-19, 1984

- HAUSKA, G. et TREBST, A.: Proton translocation in chloroplasts
Current Topics in Bioenergetics 6, 152-210, Academic Press, New York, 1977
- HELDT, H.W.: Adenine nucleotide translocation in spinach chloroplasts
FEBS Lett. 5, 11-14, 1969
- HELDT, H.W., WERDAN, K., MILOVACEV, M. et GELLER, G.: Alkalization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space
BBA 314, 224-241, 1973
- HORWICH, A.L., KALOUSEK, F., MELLMAN, I. et ROSENBERG, L.E.: A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein
The Embo J. 4, 1129-1135, 1985
- HUNTER, T. et COOPER, J.A.: Protein-tyrosine kinases
Ann. Rev. Biochem. 54, 897-930, 1985
- INOUE, Y., KOBAYASHI, Y., SHIBATA, K. et HEBER, U.: Synthesis and hydrolysis of ATP by intact chloroplasts under flash illumination and in darkness
BBA 504, 142-152, 1978
- JACKSON, C. et MOORE, A.L.: in: Plant organelles
(REID, E. Ed.), 1-13, Horwood, Chichester
- JOHNSON, D.A., GANTSCH, J.W., SPORTSMAN, J.R. et ELDER, J.H.: Improved technique utilizing non-fat dry milk for analysis for proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose
Gene Anal. Techn. 1, 3-8, 1984
- KANNANGARA, C.G., GOUGH, S.P., HANSEN, B., RASMUSSEN, J.N. et SIMPSON, D.J.: A homogenizer with replaceable razor blades for bulk isolation of active barley plastids
Carlsberg Res. Commun. 42, 431-439, 1977
- KEEGSTRA, K., WERNER-WASHBURNE, M., CLINE, K. et ANDREWS, J.: The chloroplast envelope: Is it homologous with the double membrane of mitochondria and gram-negative bacteria ?
J. of Cell. Biochem. 24, 55-68, 1984
- KIRK, J.T.O. et TILNEY-BASSETT, R.A.E.: The plastids, Elsevier/North Holland Publ., Amsterdam, 1977
- KNECHT, D.A. et DIMOND, R.L.: Visualization of antigenic proteins on Weston blots
Analytic Biochemistry 136, 180-184, 1984
- KRIEG, P.A. et MELTON, D.A.: Functional messenger RNAs are produced by SP 6 in vitro transcription of cloned cDNAs
Nuc. Acid Res. 12, 7057-7070, 1984

- KUHN, A., WICKNER, W. et KREIL, G.: The cytoplasmic carboxy terminus of M13 procoat is required for the membrane insertion of its central domain
Nature 322, 335-339, 1986
- van LOON, A.P.G.M., BRÄNDLI, A.W. et SCHATZ, G.: The presequence of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochondrial sorting
Cell 44, 801-812, 1986
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, H.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951
- MANDEL, M. et HIGA, A.: Calcium-dependent bacteriophage DNA infection
J. Mol. Biol. 53, 154-162, 1970
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. et SAMBROCK, J.: Molecular cloning
Cold Spring Harbor Laboratory, 196-197, Cold Spring Harbor, N.J., 1982
- MCCARTY, D.R. et SELMAN, B.R.: Properties of a partially purified nucleoside triphosphatase (NTPase) from the chloroplast envelope of pea
Plant Physiol. 80, 908-912, 1986
- MORI, M., MORITA, T., MIURA, S. et TATIBANA, M.: Uptake and processing of the precursor for rat liver ornithine transcarbamylase by isolated mitochondria
J. Biol. Chem. 256, 8263-8266, 1981
- NAKATANI, H.J. et BARBER, J.: An improved method for isolating chloroplasts retaining their outer membranes
BBA 461, 510-512, 1977
- NELSON, N. et SCHATZ, G.: Energy-dependent processing of cytoplasmically made precursor to mitochondrial proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4365-4369, 1979
- NEUPERT, W. et SCHATZ, G.: How proteins are transported into mitochondria
Trends Biochem. Sci. 6, 1-4, 1981
- NEWMAYER, D.D., LUCOCO, J.M., BÜRGLIN, T.R. et De ROBERTIS, E.M.: Assembly in vitro of nuclei active in nuclear protein transport: ATP is required for nucleoplasmin accumulation
The Embo J. 5, 501-510, 1986
- NGUYEN, T.D. et SIEGENTHALER, P.A.: Proteins and polypeptides of envelope membranes from spinach chloroplasts
FEBS Lett. 164, 67-70, 1983
- NOVAK, P., RAY, H.P. et DEV, J.K.: Localization and purification of two enzymes from E. coli capable of hydrolyzing a signal peptide
J. Biol. Chem. 261, 420-427, 1986

ONO, H. et TUBOI, S.: Translocation of proteins into rat liver mitochondria
Eur. J. Biochem. 155, 543-549, 1986

PFANNER, N. et NEUPERT, W.: Transport of F-ATPase subunit B into mitochondria depends on both a membrane potential and nucleoside triphosphates
FEBS Lett. 209, 152-156, 1986

PFANNER, N. et NEUPERT, W.: Transport of proteins into mitochondria: a potassium diffusion potential is able to drive the import of ADP/ATP carrier
The Embo J. 4, 2819-2825, 1985

PFISTERER, J., LACHMANN, P. et KLOPPSTECH, K.: Transport of proteins into chloroplasts: Binding of nuclear-coded chloroplast proteins to the chloroplast envelope
Eur. J. Biochem. 162, 143-148,

REED, P.W.: Ionophores
Methods in Enzymology LV, 435-454, 1979

REID, G.A.: Transport of proteins into mitochondria
Current Topics in Membranes and Transport 24, 295-336, 1985

REID, G.A., YONETANI, T. et SCHATZ, G.: Import of proteins into mitochondria
J. Biol. Chem. 257, 13068-13074, 1982

REID, G.A. et SCHATZ, G.: Import of proteins into mitochondria
J. Biol. Chem. 257, 13056-13061, 1982

ROBERTS, B.E. et PATERSON, B.C.: Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9 S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2330-2334, 1973

ROBINSON, S.P. et WISKICH, J.T.: Pyrophosphate inhibition of carbon dioxide fixation in isolated pea chloroplasts by uptake in exchange for endogenous adenine nucleotides
Plant Physiol. 59, 422-427, 1977

ROBINSON, S.P.: The involvement of stromal ATP in maintaining the pH gradient across the chloroplast envelope in the light
BBA 806, 187-194, 1985

ROTHBLATT, J.A. et MEYER, D.J.: Secretion in yeast: translocation and glycosylation of prepro- factor in vitro can occur via an ATP-dependent posttranslational mechanism
The Embo J. 5, 1031-1036, 1986

SCHLEYER, M., SCHMIDT, B. et NEUPERT, W.: Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria
Eur. J. Biochem. 125, 109-116, 1982

SCHLEYER, M. et NEUPERT, W.: Transport of proteins into mitochondria: Translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes
Cell 43, 339-350, 1985

SANGER, F., MICKLEN, S. et COULSON, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467, 1977

SASAKI, Y., TOMADA, Y. et KAMIKUBO, T.: Synthesis of ribulose biphosphate carboxylase in greening pea leaves
Eur. J. Biochem. 152, 179-186, 1985

SILHAVY, T.J., BENSON, S.A. et EMR, S.D.: Mechanisms of protein localization
Microbiol. Rev. 47, 313-344, 1983

SMITH, S.M. et ELLIS, R.J.: Processing of small subunit precursor of ribulose biphosphate carboxylase and its assembly into whole enzyme are stromal events
Nature 278, 662-664, 1979

SOLL, J. et BUCHANAN, B.B.: Phosphorylation of chloroplast ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit by an envelope-bound protein kinase in situ
J. Biol. Chem. 258, 6686-6689, 1983

SOLL, J.: Phosphoproteins and protein kinase activity in isolated envelopes of pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts
Planta 166, 394-400, 1985

SOLL, J., WANNER, G., HENKELMANN, G., RÖPER, U. et SCHULZE, M.: Isolation of a fraction enriched in envelope membranes from purified pea (*Pisum sativum* L.) etioplasts
Plant Biology Vol 2: Regulation of Chloroplast Differentiation, 229-234, Alan R. Liss Inc., New York, 1986

STITT, M., WIRTZ, W. et HELDT, H.W.: Metabolite levels during induction in the chloroplast and extrachloroplast compartments of spinach chloroplasts
BBA 593, 85-102, 1980

THOMPSON, W.F., EVERETT, M., POLANS, N.O., JORGENSEN, R.A. et PALMER, J.D.: Phytochrome control of RNA levels in developing pea and mung-bean leaves
Planta 158, 487-500, 1983

TORRIANI, A.: in: Methods in Enzymology (GROSSMANN, L. et MOLDAVE, K. Eds.) Vol XLLB, 212-218, Academic Press, New York

WATERS, M.G. et BLOBEL, G.: Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis
J. of Cell Biology 102, 1543-1550, 1986

WEISS, B., LIVE, T.R. et RICHARDSON, C.C.: Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid
J. Biol. Chem. 243, 4513ff, 1986

WHALEY, W.G., MOLLENHAUER, H.H. et LEECH, J.H.: The ultrastructure of the meristematic cell.

Amer. J. of Bot. 77, 401ff, 1960 YAMANE, K., ICHIHARA, S. et MIZUSHIMA, S.: In vitro translocation of protein across E. coli membrane vesicles requires both the proton motive force and ATP

J. Biol. Chem. 262, 2358-2362, 1987

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. J. Soll angefertigt. Herrn Dr. Soll danke ich herzlich für die Betreuung und die stetige Anteilnahme.

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann, Botanisches Institut, danke ich für die Überlassung des Klons pPSR 6/ ES 2.

Herrn Prof. Dr. U. Henning und Herrn Dr. R. Freudl, Max-Planck-Inst. für Biologie, Tübingen, danke ich für die Überlassung des Klons pRD 87.

Herrn Prof. Dr. D. Oesterheld, Max-Planck-Inst. für Biochemie, Martinsried, danke ich für die Möglichkeit, während der Klonierungen in seiner Arbeitsgruppe als Gast zu arbeiten. Insbesondere danke ich Herrn Dr. F. Pfeiffer für die Betreuung und die vielfältigen Ratschläge in dieser Zeit. Frau C. Weyrauch hat mit vielen praktischen Hinweisen zum Gelingen der Experimente beigetragen.

Herrn G. Wanner, Botanisches Institut, danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Plastiden.

Aus unserem Arbeitskreis danke ich insbesondere Michaela Schulze für die Unterstützung bei der Etioplastenpräparation.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen anderen, die mich bei der Arbeit freundschaftlich unterstützten. Peter danke ich für die geduldige Anteilnahme und die Niederschrift der Arbeit.

LEBENS LAUF

20. Oktober 1958 geboren in Basel, Schweiz
- 1965 - 1968 Einschulung, Grundschule Weiherhof, Freiburg i.B.
- 1968 - 1972 Besuch des Mädchengymnasiums St. Ursula, Freiburg
- 1972 - 1977 Besuch des Tulla-Gymnasiums, Mannheim
10. Mai 1977 Abitur
- 1977 - 1983 Studium der Fächer Biologie und Chemie für das
Lehramt an Gymnasien, Ludwig-Maximilians-Universität
München
19. 12. 1983 Erstes Staatsexamen
1. 2. 1984 Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation
unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. J. Soll

